



# Synthèse chimioenzymatique d'analogues de monosaccharides utilisés comme sondes pour le développement d'un test de sélection de la transcétolase de *Saccharomyces cerevisiae* basé sur l'auxotrophie

Grégory Simon

## ► To cite this version:

Grégory Simon. Synthèse chimioenzymatique d'analogues de monosaccharides utilisés comme sondes pour le développement d'un test de sélection de la transcétolase de *Saccharomyces cerevisiae* basé sur l'auxotrophie. Chimie organique. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2009. Français. NNT : 2009CLF22005 . tel-00724437

**HAL Id: tel-00724437**

**<https://theses.hal.science/tel-00724437>**

Submitted on 21 Aug 2012

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre : 2005

# **UNIVERSITÉ BLAISE PASCAL**

(U.F.R. de Recherche Scientifique et Techniques)

## **ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES FONDAMENTALES** N°632

### **THÈSE**

présentée pour obtenir le grade de

### **DOCTEUR D'UNIVERSITÉ**

(Spécialité : CHIMIE ORGANIQUE BIOLOGIQUE, Mention : Biochimie)

PAR

**SIMON Grégory**

Synthèse chimioenzymatique d'analogues de monosaccharides  
utilisés comme sondes pour le développement d'un test de sélection  
de la transcétolase de *Saccharomyces cerevisiae* basé sur l'auxotrophie

Soutenue publiquement le 18 décembre 2009 devant la commission d'examen :

Présidente : A.-M. DELORT, Directrice de recherche CNRS, Université Blaise Pascal

Rapporteurs : C. TELLIER, Professeur, Université de Nantes  
M. THERISOD, Professeur, Université Paris-Sud 11

Examineurs : M. BOUZON-BLOCH, chercheur CEA, Genoscope, Evry  
L. HECQUET, Professeur, Université Blaise Pascal  
V. HELAINE, Maître de conférences, Université Blaise Pascal



## Remerciements

Ce travail de recherche a été réalisé au laboratoire de Synthèse et Etudes de Systèmes à Intérêt Biologique (SEESIB, UMR CNRS 6504) de l'Université Blaise Pascal dirigé par Madame Anne-Marie Delort, en collaboration avec le CEA-Genoscope à Evry.

J'exprime ma profonde gratitude à Madame Laurence Hecquet, Professeur à l'Université Blaise Pascal qui a encadré ce travail de thèse, à Monsieur Philippe Marlière (DG Isthmus, Evry) et à Madame Madeleine Bouzon-Bloch, chercheur au CEA-Genoscope pour leurs conseils et leurs qualités scientifiques et humaines.

J'adresse mes remerciements à Franck Charmantray, Chargé de Recherche au CNRS et Virgil Hélaine, Maître de Conférences pour leurs conseils en chimie organique, en synthèse enzymatique et en enzymologie, ainsi que pour leur disponibilité, leur amitié et leur soutien. Je tiens aussi à remercier Bertrand Légeret, Ingénieur d'Etudes CNRS, Vincent Théry, Maître de Conférences, Lionel Nauton, Ingénieur d'Etudes CNRS et Johan Fanton, pour leur contribution à ce travail de recherche.

J'exprime également ma gratitude aux membres de l'Equipe Valorisation des Applications du CEA-Génoscope : Dominique Louis, Valérie Pezo, Valérie Delmas et Lan Nguyen, pour leur accueil, leur disponibilité et leur aide précieuse en microbiologie et biologie moléculaire.

Je tiens à témoigner ma gratitude à Monsieur Charles Tellier, Professeur à l'Université de Nantes et Monsieur Michel Thérissod, Professeur à l'Université Paris-Sud 11, pour avoir accepté d'examiner ce travail en qualité de rapporteurs.

Un très grand merci à tous mes collègues de thèse (et les autres) pour leur amitié et leur bonne humeur : Emma, Johan, Anthony, Marielle, Carlos, Flora, Cécile, Aurélien, Sidonie, Martine, Mickaël, Stéphane, Anne-So, Sophie, Mounir, Marie-Laure, Nico, José, Emmanuelle, Zeinab.

Enfin, j'ai une pensée toute particulière pour mes parents et ma sœur qui ont toujours cru en moi, qui m'ont accompagné et soutenu au cours de ce long parcours universitaire.



## Liste des abréviations

7-ADCA	Acide 7-aminodésacétoxycéphalosporanique
ADH	Alcool déshydrogénase
ADN (ou DNA)	Acide désoxyribonucléique
AMP	Adénosine phosphate
ANEH	Epoxyde hydrolase d' <i>Aspergillus niger</i>
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
BSA	Sérum albumine bovine
CAST	Combinatorial Active-Site Saturation Test
CoA	Coenzyme A
D-AAO	D-amino-oxydase
DERA	2-désoxy-D-ribose-5-phosphate aldolase
Dex	Dexaméthasone
D-FDP	D-fructose-1,6-bisphosphate
D-G3P	D-glycéraldéhyde-3-phosphate
dGTP	Désoxyguanosine triphosphate
DHA	Dihydroxyacétone
DHAP	Dihydroxyacétone phosphate
DHFR	Dihydrofolate réductase
DIBAL-H	Hydruure de diisobutylaluminium
dITP	Désoxyinosine triphosphate
DMF	N,N-diméthylformamide
dNTP	Désoxyribonucléotide triphosphate
E	Coefficient d'énantiosélectivité
ee	Excès énantiomérique
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FDPA	Fructose-1,6-bisphosphate aldolase
FSA	Fructose-6-phosphate aldolase
FruA	Fructose-1,6-bisphosphate aldolase
GC	Chromatographie en phase gazeuse
$\alpha$ -GPDH	$\alpha$ -glycérophosphate déshydrogénase
GR	Récepteur aux glucocorticoïdes
GSSM	Gene Site Saturation Mutagenesis_
HDMF	4-hydroxy-2,5-diméthyl-3(2 <i>H</i> )-furanone
HPA	Acide hydroxypyruvique

IPG	1,2-O-isopropylidène glycérol
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
$k_{cat}$	Constante catalytique
KDGP aldolase	D-2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate aldolase
$K_m$	Constante de Michaelis
LC	Chromatographie en phase liquide
LDH	L-lactate déshydrogénase
MAP	2-méthyl-4-aminopyrimidine
MS	Spectrométrie de masse
MT	4-méthyl-thiazolium
Mtx	Méthotrexate
NAD(H)	Nicotinamide dinucléotide
NADP(H)	Nicotinamide dinucléotide phosphate
NBT	Nitroblue tétrazolium
NTA	Acide nitriloacétique
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEP	Phosphoénolpyruvate
PFK1	Phosphofructokinase 1
PM	Poids moléculaire
PMS	Phénazine méthosulfate
PRPP	5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate
PTE	Phosphotriestérase
QCM	QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis
RhaD	L-rhamnulose 1-phosphate aldolase
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SGAT	Sérine aminotransférase
SOE-PCR	Single Overlap Extension-PCR
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBAF	Fluorure de tétrabutylammonium
TBS	<i>ter</i> butyldiméthylsilyle
TEA	Triéthanolamine
ThDP	pyrophosphate de thiamine
THF	Tétrahydrofurane
TK	Transcétolase
Tm	Température de fusion
TPI	Triose phosphate isomérase
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside

## **Sommaire**





<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>1</b>
<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>9</b>
<b>CHAPITRE I : AMELIORATION ET MODIFICATION DES ENZYMES .....</b>	<b>11</b>
1. INTRODUCTION .....	11
2. CREATION DE LA DIVERSITE AU NIVEAU DES GENES .....	13
2.1. Mutagenèse aléatoire .....	13
2.2. Mutagenèse dirigée .....	14
2.3. Mutagenèse « semi-rationnelle » au niveau d'une séquence ou d'un gène entier .....	15
3. METHODES DE SELECTION ET DE CRIBLAGE .....	20
3.1. Méthodes de criblage .....	21
3.2. Méthodes de sélection basées sur la survie cellulaire .....	27
3.3. Conclusion .....	31
4. EXEMPLES DE STRATEGIES UTILISEES POUR MODIFIER DES ENZYMES PAR MUTAGENESE.....	32
4.1. Relations entre les positions des mutations et les propriétés des enzymes mutées.....	32
4.2. Exemples d'amélioration et modification d'enzymes.....	32
5. CONCLUSION .....	36
<b>CHAPITRE II : LA TRANSCETOLASE.....</b>	<b>37</b>
1. ROLE DE LA TK <i>IN VIVO</i> .....	37
1.1. Réaction catalysée <i>in vivo</i> par la TK.....	37
1.2. Rôle de la TK chez les microorganismes et les organismes supérieurs .....	38
2. SEQUENÇAGE ET SUREXPRESSION DES TK .....	42
2.1. Séquençage .....	42
2.2. Surexpression et purification des TK.....	43
3. ETUDE CRISTALLOGRAPHIQUE DES TK .....	45
3.1. Structures tridimensionnelles.....	45
3.2. Etude du site actif de la TK en présence des cofacteurs .....	47
3.3. Etude du site actif de la TK en présence de ses substrats .....	48
4. MECANISME REACTIONNEL DE LA TK .....	55
5. ETUDE ET MODIFICATION DE LA SPECIFICITE DE SUBSTRAT DE LA TK.....	56
5.1. Etude de la spécificité de la TK .....	57
5.2. Exemples d'utilisation de la TK en synthèse organique .....	60
5.3. Modification de la spécificité de substrat de la TK.....	64
6. CONCLUSION .....	71
<b>RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>73</b>
<b>CHAPITRE I : SYNTHÈSE DES SONDES .....</b>	<b>75</b>
1. SYNTHÈSE DES SONDES PRESENTANT LE MOTIF CETOSE D- <i>THREO</i> .....	76
1.1. Stratégies chimioenzymatiques.....	77
1.2. Synthèse chimioenzymatique du composé 1 .....	84
1.3. Synthèse chimioenzymatique du composé 2 .....	88
1.4. Synthèse chimioenzymatique du composé 3 .....	98

1.5.	Synthèse chimioenzymatique du composé 4 .....	106
1.6.	Synthèse chimioenzymatique du composé 5 .....	113
1.7.	Bilan des synthèses des composés cétose D- <i>thréo</i> .....	116
2.	SYNTHESE DES SONDES PRESENTANT LE MOTIF CETOSE L- <i>ERYTHRO</i> .....	118
2.1.	Aldolisation asymétrique par voie chimique : l'organocatalyse .....	118
2.2.	Synthèse du composé 6.....	121
2.3.	Synthèse du composé 7 .....	123
2.4.	Bilan des synthèses des composés cétose L- <i>érythro</i> 6 et 7.....	127
3.	SYNTHESE DES SONDES PRESENTANT LE MOTIF ALDOSE D- <i>THREO</i> .....	127
3.1.	Stratégies pour accéder au motif aldose D- <i>thréo</i> .....	128
3.2.	Synthèse du composé 8.....	128
3.3.	Synthèse du composé 9.....	135
4.	CONCLUSION .....	138

## **CHAPITRE II : DEVELOPPEMENT DU TEST DE SELECTION ET INGENIERIE DE LA TRANSCETOLASE..... 141**

1.	ETUDE DE LA REACTION CATALYSEE PAR LA TK DE LEVURE EN PRESENCE DES SONDES CETOSES D- <i>THREO</i> .....	142
1.1.	Etude cinétique.....	142
1.2.	Etude par modélisation moléculaire.....	148
1.3.	Conclusion .....	150
2.	ETUDE <i>IN VIVO</i> DU TEST DE SELECTION.....	151
2.1.	Obtention des cellules auxotrophes pour la leucine et la méthionine .....	152
2.2.	Etude de croissance en présence des précurseurs des acides aminés.....	153
2.3.	Etude de croissance en présence des sondes cétose D- <i>thréo</i> 3 et 4 .....	157
2.4.	Optimisation du test de sélection en présence de la sonde 4.....	162
3.	CREATION DES BANQUES DE TK MUTEES .....	166
3.1.	Stratégie .....	167
3.2.	Création de la banque de TK mutées destinées à inverser l'énantiosélectivité.....	169

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES ..... 175**

## **PARTIE EXPERIMENTALE ..... 181**

SYNTHESE ORGANIQUE .....	183
ENZYMOLOGIE .....	241
MICROBIOLOGIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE .....	249

## **ANNEXES..... 259**

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ..... 275**

## **Introduction générale**



# INTRODUCTION GENERALE

## Contexte

Les monosaccharides représentent une classe de composés importants en biologie. Ils conduisent à de nombreuses applications dans le domaine pharmaceutique (antiviraux, antibactériens) ou encore dans le domaine agroalimentaire (arômes, édulcorants). Le rôle fondamental de ces molécules a fait de leur synthèse une cible pour de nombreuses équipes. L'intérêt majeur de la catalyse enzymatique pour accéder à ces molécules est qu'elle permet de créer des centres chiraux de configurations déterminées grâce la stéréospécificité et/ou l'énantiosélectivité des enzymes. De plus, les réactions catalysées par les enzymes étant régiosélectives, la protection des différents groupements fonctionnels n'est pas nécessaire ce qui permet de diminuer le nombre des étapes de synthèse et d'améliorer le bilan énergétique et environnemental. L'utilisation d'enzymes est donc particulièrement bien adaptée à la synthèse de monosaccharides, molécules fonctionnalisées présentant de nombreux centres asymétriques.

Les réactions qui catalysent la formation stéréospécifique d'une liaison C-C permettent d'accéder à ces composés en peu d'étapes tout en apportant la chiralité souhaitée. Deux approches sont développées actuellement : la voie chimique avec notamment l'organocatalyse asymétrique (utilisation d'acides aminés chiraux) et la biocatalyse (utilisation d'enzymes). Ces stratégies ont en commun de catalyser des réactions d'addition nucléophile d'un cétole ou d'un aldol (substrat donneur) sur un aldéhyde (substrat accepteur). Plus précisément, il peut s'agir :

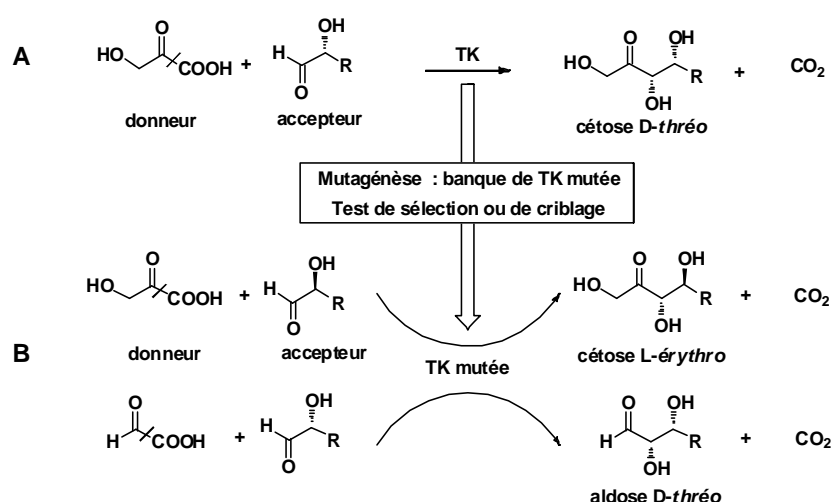
- de réactions d'aldolisation grâce à l'utilisation d'enzymes appartenant à la classe des lyases comme les aldolases et à l'organocatalyse en présence d'acides aminés chiraux
- de réactions de transfert d'un groupement cétole sur une fonction aldéhyde catalysée par les transférases, classe à laquelle appartient la transcétolase (TK).

Notre laboratoire s'intéresse depuis plusieurs années à la TK (E.C.2.2.1.1). Cette enzyme catalyse la formation stéréospécifique d'une liaison C-C. Elle transfère un groupement hydroxyacétyle d'un substrat donneur sur un substrat accepteur aldéhydique de préférence  $\alpha$ -hydroxylé. La réaction catalysée par cette enzyme est stéréospécifique (le nouveau carbone asymétrique formé est de configuration (S) et énantiosélective (seuls les

aldéhydes  $\alpha$ -hydroxylés de configuration *R* sont acceptés). Ainsi, il est possible d'accéder à des cétooses de configuration *D-thréo* (3*S*-4*R*). De nombreux analogues de cétooses ont déjà été préparés au laboratoire en présence d'hydroxypyruvate, substrat donneur peu coûteux est facile à synthétiser. De plus, la décarboxylation de l'hydroxypyruvate par la TK rend la réaction irréversible (Figure 1A). La TK présente donc des avantages dans le cadre d'applications en synthèse par rapport à l'utilisation des aldolases et à l'organocatalyse. Ces stratégies nécessitent respectivement l'utilisation de la dihydroxyacétone phosphate (DHAP) et de la dihydroxyacétone (DHA) protégée composés délicats à préparer. Les cétooses protégés obtenus nécessitent une ou plusieurs étapes de déprotection pour obtenir les groupements hydroxyles libres.

## Objectifs

Nous cherchons à élargir le champ d'application de la réaction catalysée par la TK qui est limité à l'obtention du motif cétoose-*D-thréo* (3*S*,4*R*). Dans ce but, la modification de la spécificité de substrat de la TK passe par la modification du gène codant pour cette enzyme. Le laboratoire s'intéresse particulièrement à la TK de *Saccharomyces cerevisiae* ayant participé à l'étude du site actif de cette enzyme en collaboration avec le Pr. Schneider de l'Institut Karolinska (Stockholm). Cette source de TK était la seule qui permettait de concilier la connaissance de la structure 3D et l'expression dans un microorganisme facile à cultiver. Depuis très peu de temps, la structure 3D de la TK d'*E. coli* a été décrite dans la littérature.



**Figure 1 : modification de la spécificité de substrat de la TK**

Nos objectifs visent à modifier la spécificité de substrat de la TK de *Saccharomyces cerevisiae* pour accéder à des motifs inaccessibles avec l'enzyme sauvage :

- motifs cétozes L-érythro (Figure 1B). Il s'agit de modifier, dans ce cas, l'énantiosélectivité vis-à-vis du substrat accepteur. Cet aspect est intéressant car, parmi les enzymes qui catalysent la formation d'une liaison C-C, seule la tagatose-1,6-bisphosphate aldolase est susceptible de conduire à ces composés. Cependant, elle n'est pas stéréosélective (<10 % composé L-érythro et > 90 % composé D-thréo). L'organocatalyse en présence L-proline permet d'accéder à cette configuration mais le substrat donneur et donc le produit de la réaction sont protégés. La modification de la TK pourrait nous permettre notamment d'accéder en une étape au D-tagatose, qui peut être utilisé comme édulcorant alimentaire.<sup>1</sup>

- motifs aldoses D-thréo (Figure 1B). Il s'agit de modifier la spécificité de la TK vis-à-vis du substrat donneur pour qu'un groupement formyle soit transféré à la place d'un groupement hydroxyacétyle. Il a été montré que la TK peut transférer un tel groupement sur un substrat accepteur mais avec une très faible activité. Les aldoses sont préparés en général par isomérisation du cétoze correspondant. La synthèse du 5-D-thioxylose (aldose D-thréo) serait intéressante car ce composé est une des cibles du laboratoire. Cette molécule est utilisée pour accéder à des composés à visée antithrombotique (une collaboration avec le groupe Fournier a été développée sur ce thème).<sup>2</sup>

## Stratégie

Dans une démarche visant à modifier les propriétés d'une enzyme, deux paramètres sont essentiels : le choix de la ou des technique(s) permettant de créer de la diversité au niveau du gène codant pour l'enzyme et le choix du test qui va permettre de mettre en évidence les propriétés recherchées au sein de la banque de clones exprimant les enzymes mutées.

■ Notre stratégie consiste d'une part à créer des banques de TK mutées par mutagenèse « semi-aléatoire » au niveau du site actif. Cette stratégie est maintenant privilégiée pour modifier la spécificité de substrat d'une enzyme (par rapport à la mutagenèse aléatoire). Le choix des résidus ou des séquences sur lesquels porteront les mutations pourra donc être guidé par la connaissance du site actif de la TK de *Saccharomyces cerevisiae*.

■ Nous avons choisi d'autre part un test reposant sur l'utilisation de sondes présentant les motifs cétoze-L-érythro et aldose D-thréo adaptées aux propriétés recherchées au sein de la banque de TK mutées. Si ces motifs sont reconnus par des TK mutées, la liaison C-C sera rompue et l'aldéhyde libéré permettra de détecter l'activité de la TK grâce au groupement R<sub>4</sub> qui est l'élément clé dans notre approche (Figure 2).



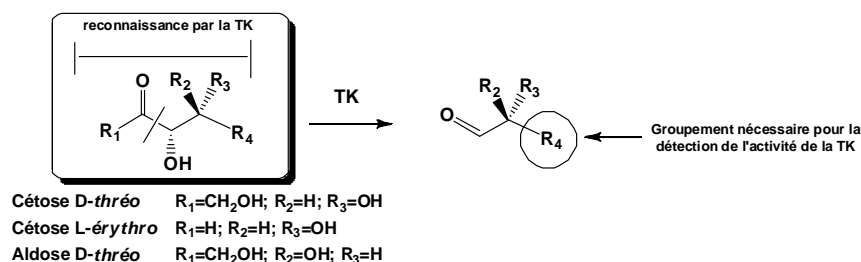


Figure 2 : Sondes utilisées pour détecter l'activité de la TK

Ainsi, en raison de la réversibilité de la réaction, une TK mutée reconnaissant le motif cétose-L-*érythro* ou aldose D-*thréo* des sondes pourrait être capable de créer ces motifs en présence des substrats donneurs et accepteurs que nous souhaitons utiliser dans un but synthétique (Figure 3).

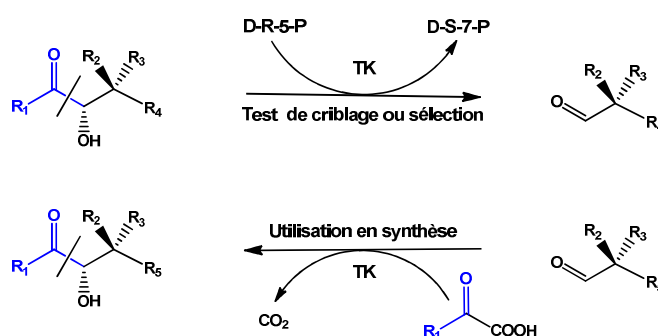


Figure 3 : Réversibilité de la réaction catalysée par la TK

Le groupement  $R_4$  des sondes intervenant dans le test développé dans le cadre de cette thèse a été choisi en fonction des acquis de l'équipe. En effet, des travaux antérieurs menés au laboratoire ont conduit au développement d'un test de criblage en présence de sondes fluorogéniques précurseurs de l'umbelliférone ( $R_4 = \text{coumarine}$ )<sup>3</sup> (Figure 4). L'aldéhyde libéré à l'issue de la réaction catalysée par la TK subit une réaction de  $\beta$ -élimination de l'umbelliférone hautement fluorescente en présence de la BSA.

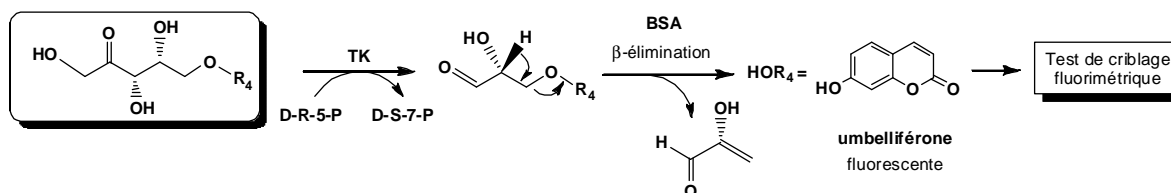


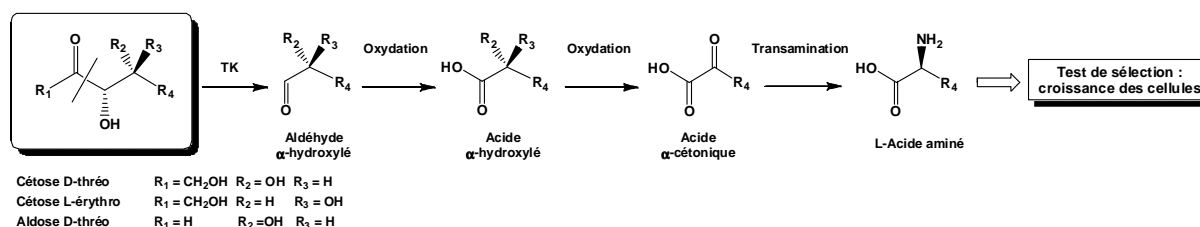
Figure 4 : Test de criblage fluorogénique

Dans cette approche, nous nous sommes heurtés à plusieurs problèmes : (1) ce test n'est réalisable que *in vitro* et le criblage d'une banque de mutants nécessite l'extraction des TK mutées pour chaque clone (2) la présence du groupement coumarinyle réduit l'affinité des sondes pour le site actif de la TK (3) la fragilité de la liaison éther conduit en l'absence de TK à la libération de l'umbelliférone dont il est difficile de s'affranchir. Ainsi, la mise en

évidence de très faibles activités chez les TK mutées est donc compromise en utilisant ce type de composés.

Compte-tenu de ces résultats, nous avons entrepris dans le cadre de cette thèse de développer une alternative qui permettrait de résoudre les problèmes évoqués ci-dessus : (1) en mettant en place un test de détection *in vivo* de l'activité de la TK applicable au criblage de larges banques d'enzymes mutées (2) en utilisant des sondes présentant le motif indispensable à la reconnaissance par la TK et un groupement R<sub>4</sub> qui serait moins encombré pour une meilleure affinité vis-à-vis du site actif et (3) lié par une liaison C-C.

Dans cette stratégie les sondes utilisées doivent être spécifiques de la propriété recherchée chez la TK et conférer au microorganisme hôte un avantage sélectionnable. Nous avons conçu des composés comportant un motif reconnu par la TK naturelle (cétose D-*thréo*) ou mutée (cétose L-*érythro* ou aldose D-*thréo*) et la chaîne latérale d'un acide aminé (R<sub>4</sub>) susceptible d'être transformé *in vivo* en l'acide aminé correspondant selon le schéma proposé ci-dessous (Figure 5). La première étape de cette cascade de réactions est conditionnée par la reconnaissance du motif hydroxylé par la TK. La liaison C-C de la sonde sera alors rompue et conduira à la libération de l'aldéhyde α-hydroxylé qui sera pris en charge par le métabolisme de la cellule hôte pour donner l'acide aminé correspondant.



**Figure 5 : Principe du test de sélection**

La transformation des sondes en acide aminé sera réalisée dans des souches d'*Escherichia coli* auxotrophes (incapables de se développer à l'absence de l'acide aminé dans le milieu de culture). Seules les cellules exprimant la TK capable de reconnaître le motif glycosylé de la sonde introduite dans le milieu de culture pourront produire l'acide aminé nécessaire à la complémentation de leur besoin nutritionnel.

Nous avons choisi la nature des chaînes latérales (R<sub>4</sub>) en fonction de différents paramètres :

- (1) la présence d'une chaîne linéaire, compte tenu de la faible activité de la TK en présence de sondes portant un cycle (R<sub>4</sub>= tyrosine)<sup>4</sup> ou un bicyclic (R<sub>4</sub>= umbelliférone) comme l'ont montré des travaux antérieurs menés au laboratoire<sup>3</sup>.

- (2) la présence d'une chaîne aliphatique non ramifiée ( $R_4=CH_3$ , groupement le plus simple chaîne latérale de l'alanine), ramifiée ( $R_4 = CH(CH_3)_2$ , chaîne latérale de la valine) ou  $R_4=CH_2-CH(CH_3)_2$  chaîne latérale de la leucine) ou encore comportant un hétéroatome ( $R_4=CH_2-CH_2SCH_3$  chaîne latérale de la méthionine et  $R_4=CHOH-CH_3$  chaîne latérale de la thréonine)

Le premier objectif est d'étudier l'activité de la TK sauvage sur ces nouveaux substrats donneurs (cétose *D-thréo*) qui diffèrent par la nature de la chaîne latérale plus ou moins encombrée et/ou hydrophobe. Ces composés seront préparés par voie chimioenzymatique.

Le deuxième objectif est d'évaluer la faisabilité du test de sélection en présence des sondes qui seront testées *in vivo* (en présence des cellules auxotrophes exprimant la TK sauvage de levure) pour vérifier si elles sont précurseurs des acides aminés correspondants. Dans l'optique d'utiliser cette stratégie pour la sélection de TK mutées les sondes présentant les motifs *L-érythro* et aldoses *D-thréo* seront synthétisées par voie chimique ou chimioenzymatique.

Dans une première partie nous allons présenter une analyse de la bibliographie en rapport d'une part avec l'amélioration et la modification de la spécificité de substrat d'enzymes (techniques de mutagenèse et tests de criblage et de sélection actuellement utilisés) et d'autre part avec la TK en nous attachant plus particulièrement à sa structure, ses propriétés, son mécanisme enzymatique et à ses applications en synthèse.

Dans la seconde partie nous présenterons et discuterons les résultats concernant tout d'abord la synthèse des sondes par voie chimioenzymatique puis le développement du test de sélection (études *in vitro* en présence de la TK sauvage et *in vivo* en présence du microorganisme hôte auxotrophe *E. coli*) et pour finir par l'ingénierie de la TK de levure (création des banques de TK mutées).

Nous concluons et nous indiquerons les perspectives offertes par l'ensemble de ces travaux.

## **Etude bibliographique**



# CHAPITRE I : AMELIORATION ET MODIFICATION DES PROPRIETES DES ENZYMES

## 1. Introduction

Ces dernières années, le pouvoir catalytique des enzymes a été de plus en plus utilisé dans de nombreux domaines, notamment dans ceux de la chimie fine, de la pharmacie et de l'environnement. Cependant, en raison de leur spécificité de substrat et de leur instabilité dans des conditions non physiologiques, l'utilisation des enzymes est freinée dans des procédés industriels qui nécessitent souvent des conditions extrêmes de pH, de hautes températures, la présence de solvants organiques, de détergents et aussi de substrats dont la structure est souvent très éloignée des substrats naturels. Dans de telles conditions, les enzymes ont une faible activité et peuvent même être dénaturées. Pour ces raisons, est née l'idée de créer des enzymes exactement adaptées aux paramètres optimaux recherchés. Le but est ainsi d'améliorer ou de modifier leurs propriétés catalytiques pour optimiser les procédés de biotransformation.

Au cours des trente dernières années, l'évolution des techniques d'ingénierie des protéines a permis d'améliorer ou modifier les propriétés d'enzymes sauvages par mutations ponctuelles grâce à la mutagenèse dirigée, la mutagenèse aléatoire et plus récemment par recombinaison (DNA shuffling) (Figure 6).

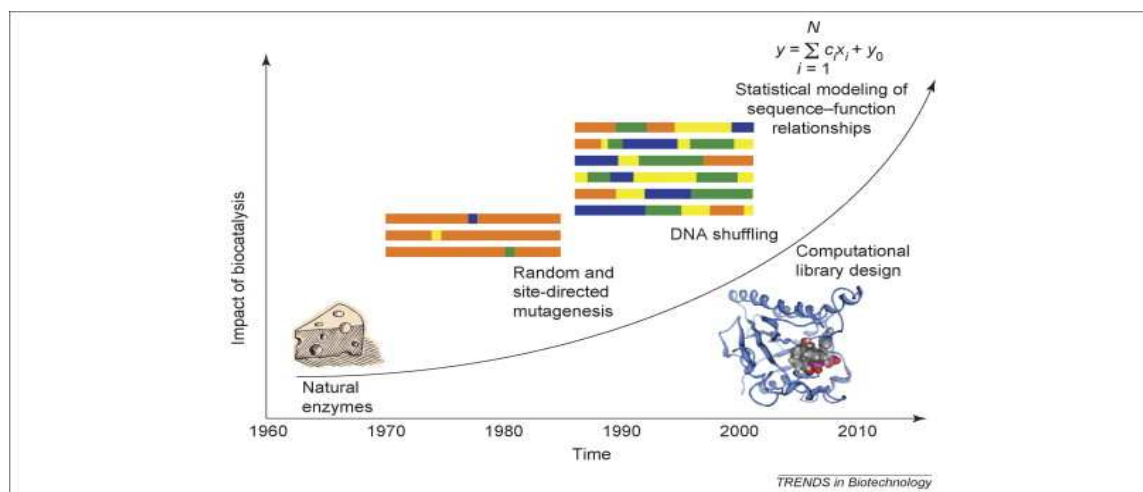


Figure 6 : Evolution des techniques utilisées pour la modification d'enzymes

Au début des années 1990, une technologie a été créée par Arnold en 1993<sup>5</sup> et par Stemmer en 1994<sup>6</sup> : l'évolution dirigée appelée également évolution *in vitro*. Elle consiste à reproduire *in vitro* l'évolution naturelle qui a permis aux organismes à s'adapter aux

conditions environnementales en réduisant l'échelle temps (du million d'années à quelques mois). L'évolution dirigée conduit à une librairie d'enzymes mutées *via* des mutations ponctuelles et/ou des recombinaisons à partir du gène parental. L'enzyme mutée présentant les propriétés recherchées est ensuite mise en évidence par un test de sélection ou de criblage. L'intérêt majeur de l'évolution *in vitro* est de permettre une amélioration de l'efficacité de l'enzyme mutée en soumettant le gène correspondant à d'autres cycles de mutagenèse (Figure 7).

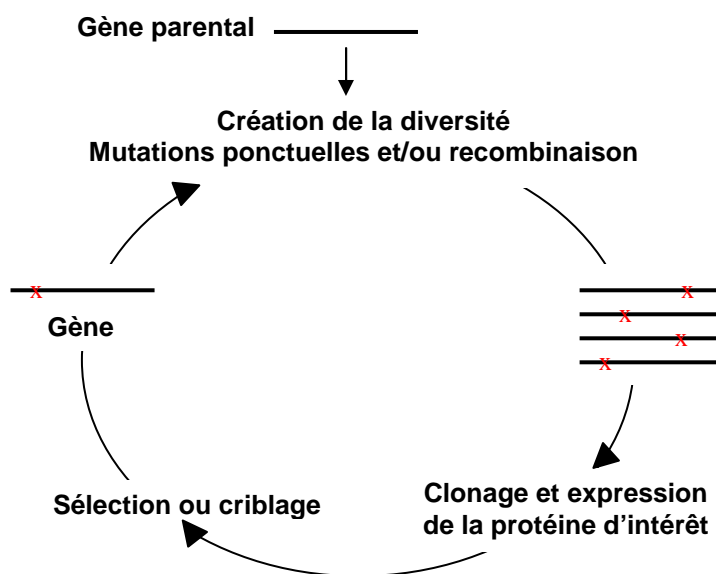


Figure 7: Les étapes d'un cycle d'évolution *in vitro*

De très nombreuses stratégies conduisant à la modification d'enzymes sont décrites dans la littérature et leur succès repose essentiellement sur deux aspects essentiels:

- le premier consiste à utiliser une stratégie efficace pour créer la diversité au niveau d'un gène qui sera surexprimé dans un microorganisme hôte adapté. Les premiers travaux privilégiaient des tailles de librairies allant de  $10^8$  à  $10^{10}$ , l'hypothèse était qu'il y avait plus de chances de trouver le mutant recherché parmi un large panel. A l'heure actuelle, les études se dirigent vers la création de plus petites librairies  $10^3$  à  $10^6$  obtenues avec des stratégies plus ciblées sur certaines séquences de la protéine<sup>7</sup>. Selon les travaux des chercheurs référents<sup>6,8,9</sup> dans ce domaine une stratégie efficace comporte pour chaque cycle une voir deux mutations. Au cours des générations les mutations sont accumulées, séquentiellement ou par recombinaison pour acquérir la propriété désirée<sup>10,11</sup>.

- le deuxième concerne le développement d'un test rapide, sensible et spécifique pour détecter les nouvelles propriétés de l'enzyme mutée soit par criblage (chaque protéine est

testée individuellement, si le test est jugé positif le gène correspondant est isolé) soit par sélection (toutes les protéines sont testées en même temps en général au sein des cellules hôtes ; il est alors nécessaire qu'il y ait un lien entre l'activité de l'enzyme et la survie cellulaire).

Nous allons tout d'abord exposer les différentes méthodes de biologie moléculaire permettant de générer de la diversité au niveau des gènes puis nous décrirons les différents tests actuellement utilisés pour sélectionner ou cribler des enzymes mutées. Nous indiquerons ensuite des exemples d'enzymes modifiées par mutagenèse.

## **2. Création de la diversité au niveau des gènes**

Deux types de méthodes peuvent être utilisés pour générer de la diversité : la mutagenèse et la recombinaison.

La recombinaison est une technique qui a pour rôle de brasser des fragments d'ADN provenant d'un ou plusieurs gènes(s) parental(aux) et de conduire à des gènes chimériques dans lesquels les mutations bénéfiques des gènes parentaux sont concentrés. Le « DNA shuffling » est la première méthode de recombinaison qui a été développée par Stemmer en 1994<sup>6</sup>. D'autres méthodes basées sur le même principe ont été proposées dans le but d'augmenter la part des gènes chimériques.

Nous allons nous attacher uniquement aux méthodes de mutagenèse qui permettent de générer des mutations ponctuelles sur un gène parental. L'objectif est de substituer un ou des nucléotides par un (d') autre(s) au niveau de la séquence nucléotidique et donc de remplacer un ou des acides aminés par un (d') autre(s) au niveau de la séquence protéique correspondante (mutation par substitution).

Nous allons faire un bilan des différentes techniques de mutagenèse (aléatoires, dirigées, semi aléatoires) en indiquant les caractéristiques de chacune.

### **2.1. Mutagenèse aléatoire**

La mutagenèse aléatoire génère des mutations à des endroits non définis au niveau de l'ADN. La plus ancienne et aussi la plus communément utilisée est appelée PCR infidèle ou « error-prone PCR »<sup>12</sup>. repose sur l'utilisation d'une ADN polymérase de *Thermus aquaticus*, la Taq polymérase, dont la fidélité est plus faible que les autres ADN polymérases en raison d'une activité 3'5' exonucléase moins efficace (0,001 à 0,002% d'erreur par nucléotides et par



cycle d'amplification)<sup>13</sup>. Différentes Taq polymérases sont commerciales et leurs caractéristiques varient en fonction du taux d'erreur généré et de la taille des séquences d'ADN à amplifier (de 0,8 à 3 kb). En fonction de la taille du gène d'intérêt, certains auteurs utilisent la PCR infidèle en présence de gènes entiers ou de fragments de gènes<sup>14,15</sup>. En définitive, le taux de mutation moyen obtenu par cette méthode est de l'ordre de 0,7 à 1 %<sup>13</sup>.

De nouvelles méthodes<sup>16</sup> ont été développées afin de limiter les biais introduits lors des cycles d'amplification par PCR infidèle faisant appel à de nouvelles ADN polymérases notamment humaines<sup>17</sup> ou jouant sur les conditions réactionnelles de la PCR notamment les concentrations en dNTP et Mn<sup>2+</sup> suivi d'amplification en présence de 8-hydroxy-dGTP<sup>18</sup>.

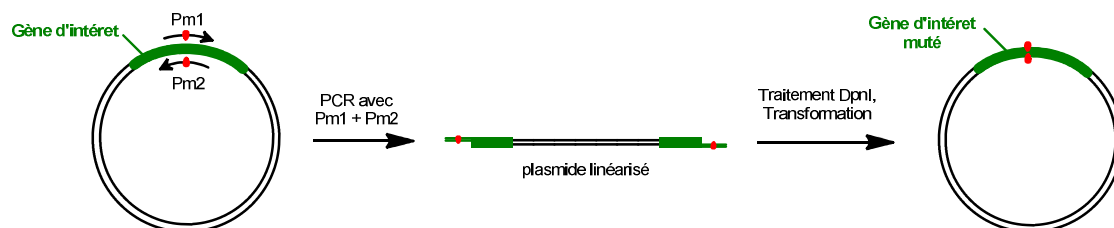
De plus, un logiciel MAP<sup>19</sup> (Mutagenesis Assistant Programm : <http://map.jacobs-university.de/MAP.html>) permet d'analyser les principales limitations indiquées ci-dessus et propose des conditions standard de PCR infidèle afin d'obtenir jusqu'à 40 % de la diversité totale possible pour une séquence donnée (la diversité totale correspondant à une substitution de tous les résidus de la séquence par les 19 autres acides aminés).

## **2.2. Mutagenèse dirigée**

La mutagenèse dirigée a pour but d'introduire une mutation dans une position précise au niveau d'une séquence d'ADN. Cette stratégie rationnelle, utilisée pour substituer un acide aminé par un autre au niveau d'une séquence protéique, nécessite de connaître la position précise de l'acide aminé que l'on souhaite muter qui est identifié d'après la structure 3D de la protéine. Plusieurs méthodes ont été développées afin d'obtenir ce type de mutation par PCR. Les plus anciennes reposent sur l'utilisation de quatre oligonucléotides (*méthode SOE-PCR ou Single Overlap Extension-PCR*<sup>20</sup>) ou deux oligonucléotides comme amorces (*méthode « méga-amorce »*<sup>21</sup>).

Il est également possible de générer les mutations directement à partir du plasmide contenant déjà le gène d'intérêt. La méthode « *QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis* » (QCM) utilisant deux amorces complémentaires brevetée par la firme Stratagene<sup>22</sup> est l'une des plus simples et des plus rapides actuellement utilisées dans les protocoles de mutagenèse dirigée (Figure 8). En effet, la mutation dans la position désirée au niveau du gène d'intérêt est introduite en une seule réaction de PCR à partir de deux oligonucléotides complémentaires portant la mutation. Du fait de la complémentarité des oligonucléotides utilisés, cette méthode ne peut pas être considérée comme une réaction de PCR à proprement parlé : seul le plasmide initial contenant le gène d'intérêt sert de matrice pour l'amplification. L'ADN néosynthétisé

par PCR à partir des oligonucléotides ne peut pas servir lui-même de matrice pour l'amplification.



**Figure 8: Méthode "QuickChange™" utilisant deux amorces complémentaires**

Cette approche présente comme avantages de ne pas nécessiter d'étape de ligation car des brins d'ADN à extrémités cohésives sont générés et de pallier à l'accumulation de mutations non désirées inhérentes aux PCR, une seule réaction de PCR étant nécessaire. Toutefois, il est nécessaire d'utiliser des oligonucléotides de 25 à 45 bases présentant comme caractéristique d'avoir une température de fusion ( $T_m$ ) supérieure ou égale à 78 °C afin de limiter leur auto-hybridation et favoriser ainsi leur hybridation à la matrice.

Des modifications ou des améliorations ont été apportées au protocole initial afin d'éviter de façon encore plus efficace le problème d'auto-hybridation des oligonucléotides<sup>23,24</sup>. Il est également possible avec cette même technique d'introduire des mutations dans deux positions différentes<sup>25</sup>.

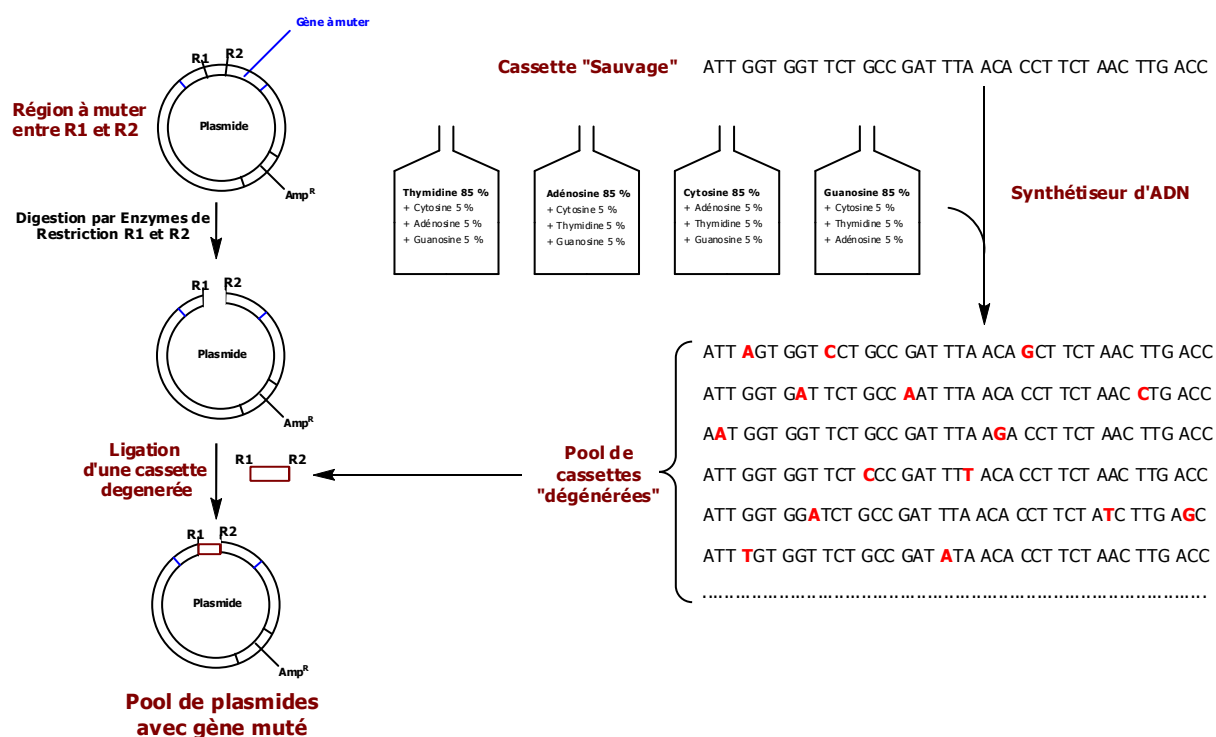
### **2.3. Mutagenèse « semi-rationnelle » au niveau d'une séquence ou d'un gène entier**

D'autres techniques que l'on peut qualifier de « semi-rationnelles » peuvent être envisagées dans l'optique de réaliser des mutations (aléatoires ou par substitution systématique d'un acide aminé par les 19 autres) sur des séquences plus ou moins grandes appelées « cassettes » identifiées au niveau du gène d'intérêt et choisies judicieusement d'après la structure 3D de la protéine correspondante. Ces méthodes peuvent aller jusqu'à réaliser la substitution systématique de chaque acide aminé d'un gène entier par les 19 autres.

#### **2.3.1. Méthodes de mutagenèse aléatoire ciblées sur une séquence déterminée du gène : mutagenèse par cassette (« cassette mutagenesis »)**

Elle consiste à remplacer une courte séquence appelée « cassette » par un fragment d'ADN synthétique contenant la séquence mutée voulue. Les mutations peuvent être introduites de façon aléatoire.

Cette approche consiste à utiliser des séquences d'ADN synthétiques contenant des mutations aléatoires dont le taux est contrôlé par le pourcentage de nucléotides contaminants ou dopés (« spiked or doped oligonucleotides ») introduits lors de la synthèse<sup>26</sup> (Figure 9). La stratégie consiste à utiliser un synthétiseur d'ADN dont le programme a été tout d'abord établi pour obtenir la séquence sauvage d'intérêt (les 4 réservoirs de l'appareil délivrent dans ce cas chacun des 4 nucléotides nécessaires). Pour obtenir des mutations aléatoires, chaque réservoir contient alors le nucléotide principal et un faible pourcentage des trois autres nucléotides (appelé nucléotide « dopé »).



**Figure 9 : Construction d'une banque de gènes mutés par mutagenèse à cassette à partir d'oligonucléotides dopés**

Au final, le synthétiseur produit des séquences oligonucléotidiques comportant un nombre variable de mutations (en fonction du pourcentage de nucléotides « contaminants » introduits dans les réservoirs). Cette méthode permet de générer des mutations aléatoires dont le taux est contrôlé par le pourcentage de nucléotides contaminants introduits lors de la synthèse. Les brins codants et non-codants sont ensuite synthétisés à partir de ces cassettes puis mélangés dans des conditions permettant leur appariement et enfin introduits dans un plasmide. Cette stratégie présente néanmoins l'inconvénient de générer l'apparition d'acides aminés appartenant à la même ligne et/ou la même colonne que l'acide aminé d'intérêt présent dans la séquence sauvage (cf Annexe page 271).

## 2.3.2. Méthodes de mutagenèse par saturation de sites, ciblées sur un codon, une séquence déterminée ou le gène entier

### 2.3.2.1. Mutagenèse par saturation de sites (« Site-saturation mutagenesis »)

Cette méthode de mutagenèse est généralement appliquée à des résidus du site actif ou proches de celui-ci. Elle consiste à remplacer de façon systématique un résidu d'une enzyme par les 19 autres acides aminés. Ces substitutions sont réalisées par l'incorporation de codons dégénérés dans la position désirée lors de la synthèse des oligonucléotides utilisés comme amorces : la dégénérescence est introduite grâce aux différentes proportions de chaque nucléotides A,T,G,C constituant les codons désignés par les lettres NNN, NNK, NNS, ... (N = 25 % de chaque nucléotides ; K = 50 % G et 50 % T ; S = 50 % de C ou G).

Type de dégénérescence	Nombre de codons	Acides aminés
NNN	Un codon	Met, Trp
	Deux codons	Cys, Asp, Asn, Glu, Gln, His, Phe, Lys, Tyr
	Trois codons	Ile, STOP
	Quatre codons	Ala, Gly, Pro, Thr, Val
	Six codons	Leu, Arg, Ser
NNK ou NNS	Un codon	Cys, Asp, Asn, Glu, Gln, Phe, His, Ile, Lys, Met, Trp, Tyr, STOP
	Deux codons	Ala, Gly, Pro, Thr, Val
	Trois codons	Leu, Arg, Ser

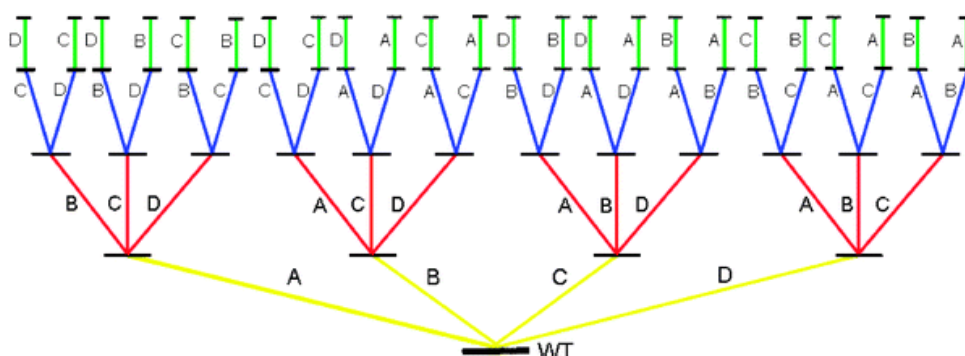
**Tableau 1 : Nombre de codons et acides aminés correspondants en fonction du type de dégénérescence utilisé**

Ainsi, il est possible de réduire les biais dûs à la redondance du code génétique c'est à dire diminuer le nombre de codons correspondants à un même acide aminé. Par exemple, des codons de type NNN permettront d'obtenir les 64 codons possibles correspondants aux 20 acides aminés incluant les biais liés à la redondance du code génétique (chaque acide aminé correspond à un, deux ou trois ou quatre codons, conduisant à une représentativité différente selon les acides aminés au niveau des séquences protéiques obtenues) (Tableau 1). Des codons dégénérés de type NNK ne conduiront qu'à seulement 32 codons (dont un codon stop) pour les 20 acides aminés minimisant donc les biais du code génétique (on augmente ainsi le nombre d'acides aminés correspondant à un seul codon ce qui conduit à une meilleure représentation de chaque acide aminé au niveau des séquences protéiques obtenues). Cette technique ne génère des mutations qu'en une position précise. Plusieurs stratégies se développent actuellement sur la base de la mutagenèse par saturation de sites dans l'objectif de créer des mutations en différentes positions de la séquence protéique.

### 2.3.2.2. Mutagenèse combinatoire par saturation de sites « Combinatorial Active-Site Saturation Test (CAST)»

Ce concept de mutagenèse développé par Reetz<sup>27</sup> consiste à effectuer des mutations aléatoires ciblées sur deux ou trois résidus constitutifs du site actif d'une enzyme. Par exemple, cette technique appliquée à deux positions au niveau d'une séquence nucléotidique va générer 1024 codons dégénérés ( $32^2$  combinaisons) si des codons de type NNK sont utilisés lors de la synthèse. Cette méthode de mutagenèse permet donc d'obtenir des effets de coopération entre les mutations générées et d'introduire une plus grande diversité qu'une démarche de saturation de site limitée à une seule position de la séquence nucléotidique qui ne génère que  $32^1$  codons dégénérés pour une démarche impliquant des codons de type NNK.

A partir de ce concept, Reetz a développé une méthode itérative<sup>28</sup> (Figure 10) : des résidus du site actifs sélectionnés d'après la structure 3D et organisés en groupes comportant de 2 à 3 résidus.



**Figure 10 : Représentation schématique de la technique « CAST » impliquant 4 sites de mutation A, B, C et D<sup>29</sup>**

A partir de chaque groupe ainsi défini, une banque de mutants est générée par la technique CAST décrite précédemment. Le criblage des différentes banques permet la mise en évidence des mutants les plus intéressants, qui servent de base à un nouveau cycle de mutagenèse. Ce processus itératif peut s'apparenter aux méthodes d'évolution dirigée en y apportant une approche plus rationnelle (ciblée sur les résidus du site actif) qui permet l'émergence des mutants d'intérêt de façon plus rapide<sup>27</sup>. De plus, la coopération entre sites mutés est très nettement amplifiée.

Les méthodes par saturation de site peuvent être optimisées en limitant le nombre d'acides aminés protéinogènes. Par exemple en utilisant un codon dégénéré de type NDT (N= 25 % de chaque nucléotides ; D = 33% de A, 33 % de G et 33% de T), on réduit le nombre d'acides aminés possibles à 12 (Phe, Leu, Ile, Val, Tyr, His, Asn, Asp, Cys, Arg, Ser, Gly).

Cette approche permet d'exclure certains acides aminés ayant des chaînes latérales présentant les mêmes caractéristiques et d'obtenir ainsi un mélange équilibré entre acides aminés polaires et non polaires, aliphatiques et aromatiques, chargés négativement et positivement. Ceci a pour effet d'une part de réduire la taille des bibliothèques de mutants générés et d'autre part d'augmenter la fréquence des mutations bénéfiques.

Une autre approche pour restreindre le nombre d'acides aminés repose sur l'analyse des homologies de séquence au sein d'une même famille d'enzyme<sup>30</sup>. Il apparaît que dans des positions précises, seuls certains acides aminés sont représentés. Les mutations introduites se limiteront donc à des substitutions par ces acides aminés.

#### 2.3.2.3. Mutagenèse par saturation de site sur un gène entier (« Gene Site Saturation Mutagenesis », GSSM<sup>TM</sup>)<sup>31</sup>

Cette technique consiste à effectuer une substitution systématique d'un acide aminé par les 19 autres acides aminés, par saturation de site sur chaque résidu de la protéine sauvage d'intérêt. Ceci est généralement obtenu par l'utilisation d'amorces PCR possédant un codon dégénéré dans chaque position de la séquence (en utilisant par exemple des codons de type NNN = 64 codons ou NNK = 32 codons). Afin d'obtenir l'ensemble des mutants désirés, il est nécessaire de produire une banque de mutants pour chaque position de la séquence protéique. Par exemple, une protéine comprenant 330 résidus, conduira à 330 banques chacune obtenue à partir de 330 amorces nucléotidiques possédant un codon dégénéré. Si une dégénérescence de type NNK est utilisée, 10560 séquences nucléotidiques seront obtenues (32 codons dégénérés possibles x 330 positions)<sup>32</sup>.

Ce type d'approche se limite à des mutations uniques et peut sembler laborieuse à développer et à mettre en place, mais elle présente de nombreux avantages : il n'est pas nécessaire de connaître la structure 3D de l'enzyme ; il est possible de créer une carte de la protéine indiquant pour chaque résidu l'influence des mutations (positive, négative ou neutre) vis-à-vis de telle ou telle propriété grâce à un test de criblage adapté. De plus, il est possible de combiner les mutations identifiées comme bénéfiques afin de créer de nouveaux mutants plus performants. Ce type de technique permet donc aussi de fournir des informations concernant le site actif, le mécanisme et la relation structure-fonction d'une protéine<sup>33</sup>.

### 3. Méthodes de sélection et de criblage

Quelque soit la technique utilisée pour générer des mutations à partir d'un gène sauvage, il est nécessaire de disposer d'un test efficace, rapide et spécifique de la propriété recherchée. Au cours des dix dernières années de nombreux travaux ont conduit au développement de tests de plus en plus ingénieux pour mettre en évidence les principales propriétés qu'il est souhaitable de modifier ou d'améliorer chez une enzyme : l'activité catalytique, la sélectivité incluant l'énantiosélectivité la diastéréosélectivité la régiosélectivité, la stabilité thermique et la résistance aux solvants organiques. Deux grandes catégories de tests peuvent être utilisées et il est nécessaire de les définir précisément<sup>34</sup> (Figure 11).

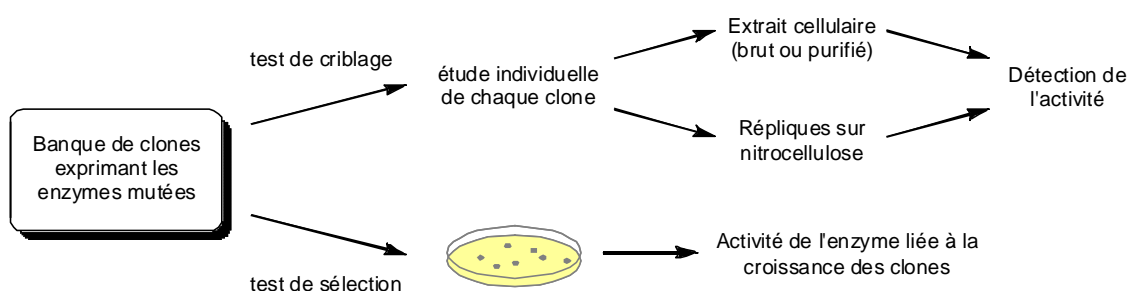


Figure 11 : Test de criblage et de sélection

➤ *Un test de criblage* sans a priori (aléatoire) nécessite d'analyser chaque mutant d'une banque pour rechercher une caractéristique particulière. Dans cette technique, il est donc nécessaire de prélever chaque clone indépendamment de façon manuelle ou automatisée et de les faire croître en microplaques 96 puits puis d'en extraire ensuite le contenu cellulaire. Le milieu réactionnel contenant l'enzyme d'intérêt purifiée ou non en présence du substrat sera analysé par une technique analytique (GC ou LC/MS). Ce type de technique est extrêmement laborieux et limite la taille des bibliothèques qu'il est possible d'analyser ( $10^3$  à  $10^4$  mutants). Le criblage dirigé ou facilité permet d'associer à la propriété recherchée un phénotype facile à reconnaître (par exemple une réaction colorée ou fluorescente). Cette technique notamment lorsqu'elle est réalisée sur boîte d'agar, directement en présence des cellules qui expriment les mutants, permet de cribler des bibliothèques de  $10^5$  à  $10^6$  mutants.

➤ *Un test de sélection* va créer un lien direct entre l'activité de l'enzyme et la survie de la cellule hôte. Ce type de test est donc beaucoup plus rapide que les précédents car il permet d'éliminer rapidement tous les mutants qui ne correspondent pas à la propriété recherchée. Ce principe prend son origine dans les tests de complémentation utilisée en

génétique et qui ont notamment étaient développés pour étudier les gènes de résistance aux antibiotiques. Ces tests de sélection permettent d'analyser des librairies de taille plus importante que les méthodes précédentes ( $10^8$  à  $10^{10}$  mutants).

### **3.1. Méthodes de criblage**

La nécessité de cribler rapidement de grandes bibliothèques de clones ou d'enzymes a conduit à automatiser les tests de criblage pour permettre une utilisation à haut débit (10 000 échantillons testés par jour) ou même à ultra-haut débit (100 000 échantillons testés par jour). Le criblage à haut débit a consisté tout d'abord à réaliser les tests dans des microplaques contenant 96 puits voire même 384 et 1536 puits. Les différentes manipulations peuvent maintenant être effectuées par des automates. Cet aspect présente des atouts majeurs. La quantité de réactifs biologiques et chimiques à introduire est bien sûr plus faible donc le coût est moindre et un grand nombre d'enzymes mutées peuvent être testées simultanément. De plus, la reproductibilité est bien meilleure. Un autre aspect consiste à améliorer la sensibilité des tests de criblage. En effet, les techniques de mutagenèse induisent la modification de l'activité catalytique de l'enzyme. Lors des premiers cycles de mutagenèse, l'activité générée est faible. Il est donc nécessaire de disposer de tests de criblage hautement sensibles.

L'activité de l'enzyme d'intérêt peut être déterminée en utilisant des dosages spectrophotométriques, fluorométriques ou spectrométriques. Certaines stratégies peuvent être développées directement en présence des substrats requis pour la réaction d'intérêt, d'autres sont facilitées soit par l'utilisation de chimiosenseurs ou de substrats modifiés.

#### **3.1.1. Méthodes spectrophotométriques et fluorométriques**

##### **3.1.1.1. Utilisation de chimio détecteurs**

Dans certains cas, le substrat ou le produit ou le changement du milieu réactionnel sont directement détectables en UV/visible ou en fluorescence. Hormis ces cas assez rares, il est possible de faire appel à des stratégies indirectes faisant intervenir des cofacteurs (notamment  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ ,  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ ) et plus fréquemment des chimio détecteurs colorimétriques ou fluorimétriques introduits dans le milieu réactionnel dont la détection correspond à la disparition du substrat ou l'apparition du produit.



### ➤ Utilisation du NAD(P)H

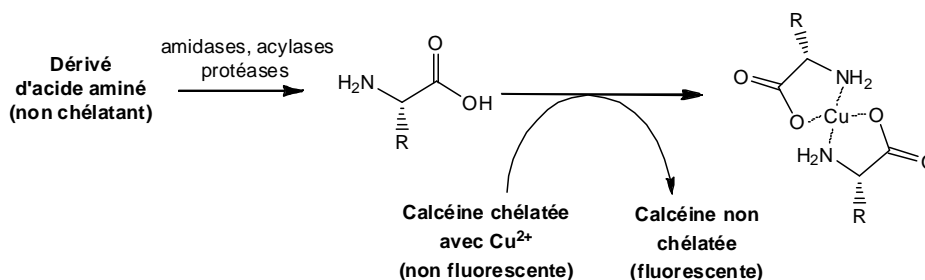
Les dérivés du nicotinamide NAD(H) (nicotinamide dinucléotide) et NADP(H) (nicotinamide dinucléotide phosphate) sont utilisés comme cofacteurs par de nombreuses oxydoréductases (hydrogénases, oxydases, oxygénases, ...). La forme réduite de ces cofacteurs présente deux maxima d'absorption à 260 et 340 nm, contrairement à leurs formes oxydées qui ne présentent qu'un seul maximum d'absorption à 260 nm. Cette caractéristique a permis de développer de nombreux tests directs d'activité pour les oxydoréductases basés sur l'augmentation ou la diminution de l'absorbance du NAD(P)H à 340 nm. Il est alors possible de déterminer l'activité de l'enzyme testée puisque la quantité de substrat disparue ou de produit formée en fonction du temps est proportionnelle à la quantité de NAD(P)H. Cependant, ces techniques ne sont pas envisageables dans le cas d'un criblage haut-débit en présence d'extrait brut. En effet, diverses oxydo-réductases présentes dans les lysats cellulaires peuvent générer un bruit de fond (réduction ou oxydation du coenzyme) et l'évolution de l'absorbance à 340 nm n'est alors pas spécifique de la réaction étudiée.

Pour palier à cet inconvénient, une stratégie originale a pu être développée avec la D-2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate aldolase (KDGP aldolase) qui a la propriété d'être thermostable. Avant l'étape de criblage des banques de KDGP aldolases mutées, les extraits bruts obtenus après lyse des cellules ont été placés à 60 °C pendant 30 à 60 minutes pour dénaturer les oxydoréductases. La L-lactate déshydrogénase a pu ensuite être utilisée comme enzyme auxiliaire en présence de NADH pour détecter spécifiquement l'activité de la KDGP aldolase en l'absence de bruit de fond<sup>35</sup>.

### ➤ Utilisation de chimiodétecteurs fluorescents

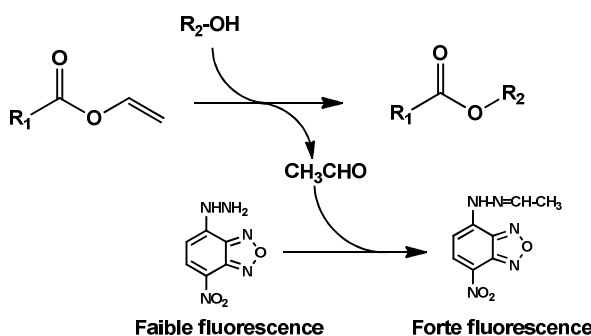
L'activité enzymatique peut être détectée par la fluorescence générée grâce à l'interaction spécifique du chimiodétecteur avec le substrat ou le produit de l'enzyme d'intérêt.

Plusieurs exemples sont décrits dans la littérature<sup>36</sup> notamment pour détecter des acides aminés (alanine, sérine, glycine, valine, histidine, cystéine, méthionine, leucine, ...) en présence de calcéine chélaté avec  $\text{Cu}^{2+}$  (non fluorescente) (Figure 12). Ce test exploite la plus grande affinité des acides aminés pour se chélater avec  $\text{Cu}^{2+}$  libérant ainsi la calcéine qui devient fluorescente. Ce test peut être utilisé pour doser l'activité catalytique de diverses amidases, acylases ou protéases dont les substrats ou les produits sont des acides aminés.



**Figure 12 : Exemple d'utilisation d'un chimiodétecteur fluorescent : dosage des acides aminés<sup>36</sup>**

D'autres chimiodétecteurs fluorogéniques de type phénylhydrazine sont utilisés notamment pour doser l'acétaldéhyde relargué lors d'une réaction de transestérification (dans le cas de lipases ou d'estérases) conduisant à la formation d'une phénylhydrazone hautement fluorescente<sup>37</sup> (Figure 13).



**Figure13 : Test fluorométrique utilisé pour détecter l'acétaldéhyde libéré lors d'une réaction de transestérification**

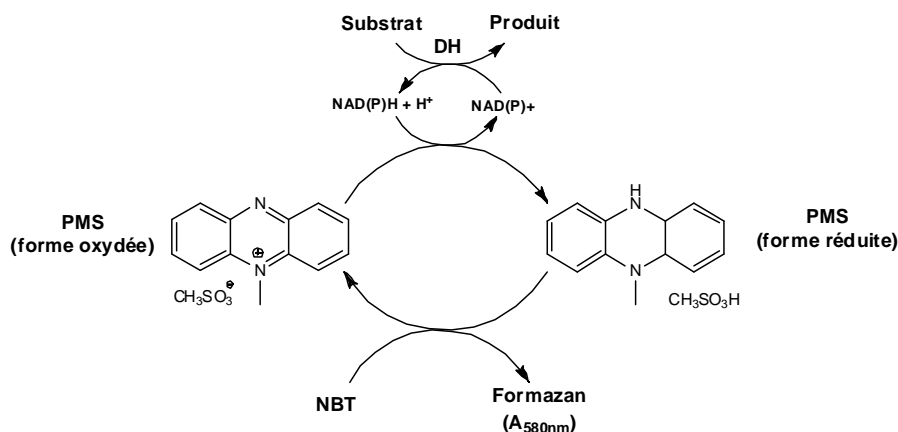
### ➤ Utilisation de chimiodétecteurs colorés

Ce type de détection repose sur l'utilisation de molécules présentant la propriété de changer de couleur dans des conditions données. Cette stratégie est particulièrement efficace lorsqu'elle est réalisable directement à partir de répliques des colonies sur membrane de nitrocellulose. Il est alors possible d'établir un lien entre l'activité enzymatique et la couleur des clones exprimant les enzymes d'intérêt.

Le « nitroblue tétrazolium » (NBT) est largement utilisé. En effet, la forme réduite des cofacteurs nicotinamide réagit avec le NBT en présence de phénazine méthosulfate (PMS) pour former un composé de type formazan qui absorbe dans le domaine du visible (580 nm) (Figure 14).

Cette technique permet dans certains cas de détecter l'activité de l'enzyme *in vivo*, directement à partir de répliques sur membrane de nitrocellulose des colonies exprimant les enzymes d'intérêt. Ces répliques sont soumises ensuite à traitement qui conduit à la lyse des cellules. Le dosage de l'activité enzymatique par la méthode NBT/PMS est ainsi réalisé

directement sur la membrane de nitrocellulose par un dosage colorimétrique. Un précipité bleu apparaîtra à l'emplacement des colonies exprimant l'enzyme d'intérêt.



**Figure 14 : Test colorimétrique NBT/PMS utilisé pour le dosage d'activité d'une déshydrogénase (DH)**

Cette approche rapide et efficace a notamment été utilisée pour le criblage à haut débit d'une banque de 6-phosphogluconate déshydrogénase mutée de *E. coli* qui a permis de mettre en évidence des mutants ayant une meilleure thermostabilité<sup>38</sup>. Dans ce cas la membrane de nitrocellulose est soumise à un traitement thermique.

Les indicateurs colorés sont également utilisés pour suivre des réactions catalysées par des enzymes qui utilisent ou produisent des molécules présentant un caractère acide ou basique (aminoacide décarboxylases, anhydrase carbonique, estérases, hexokinases, protéases, ...). Si les conditions réactionnelles sont choisies avec soin, ces méthodes peuvent être quantitatives : la différence de  $pK_a$  entre l'indicateur et le tampon doit être inférieure ou égale à 0.1 (Tableau 2).

Indicateur coloré		Tampon	
4-nitrophénol	( $pK_a = 7,15$ )	BES	( $pK_a = 7,15$ )
Rouge Chlorophénol	( $pK_a = 6,0$ )	MES	( $pK_a = 6,1$ )
Rouge Phénol	( $pK_a = 8,0$ )	EPPS	( $pK_a = 8,0$ )

**Tableau 3 : Exemple de couples indicateur/tampon utilisés pour des dosages pHmétriques**

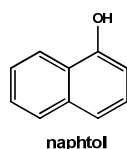
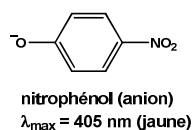
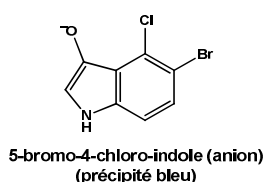
(BES = acide N,N-bis(2-hydroxyéthyl)-2-amino-éthanesulfonique ; MES = acide 2-(N-morpholino)-éthanesulfonique ; EPPS = acide N-(2-hydroxyéthyl)pipérazine-N'-3-propanesulfonique)

Les méthodes pHmétriques peuvent actuellement être réalisées en microplaques et automatisées ce qui les rend plus efficaces et moins coûteuses. Cependant, les indicateurs de pH sont moins sensibles que les chimiodétecteurs fluorescents ou colorés.

### 3.1.1.2. Utilisation de substrats chromogéniques ou fluorogéniques

Ces composés utilisés comme substrat de l'enzyme d'intérêt libèrent un groupement partant coloré ou fluorescent qui va permettre de quantifier l'activité de l'enzyme. En général, les groupements partants sont liés au substrat par des liaisons éthers ou esters de phénols aromatiques conjugués qui sont hydrolysées de façon directe ou indirecte par l'enzyme d'intérêt libérant alors la base conjuguée (Figure 15). Certains substrats sont commerciaux, notamment ceux utilisés pour les enzymes hydrolytiques (dérivés du 4-nitrophénol et de la 4-nitroaniline). Quand les substrats ne sont pas disponibles commercialement, il est nécessaire de les synthétiser. Des exemples de groupements partants sont indiqués dans la figure 14, cette liste n'est bien sûr pas exhaustive.

#### a) Groupements colorés :



#### b) Groupements fluorescents :

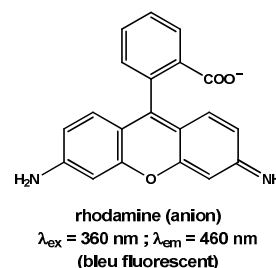
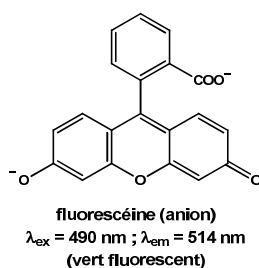
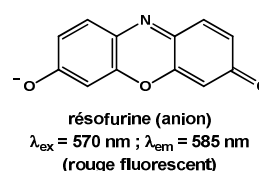
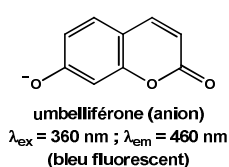


Figure15 : Exemples de dérivés phénols aromatiques conjugués (fluorescents ou colorés)

#### ➤ Composés fluorogéniques

De nombreux dérivés de l'umbelliférone ont été synthétisés pour déterminer l'activité catalytique de diverses enzymes (alcool déshydrogénase, époxydes hydrolases, transaldolases, lipases, phosphatases, acylases, ...) <sup>39</sup>.

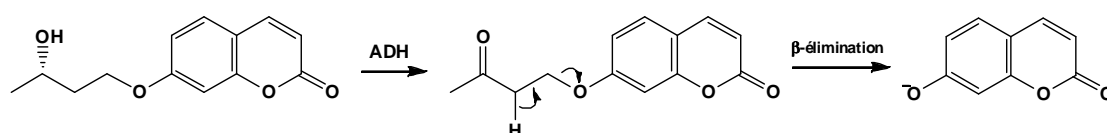
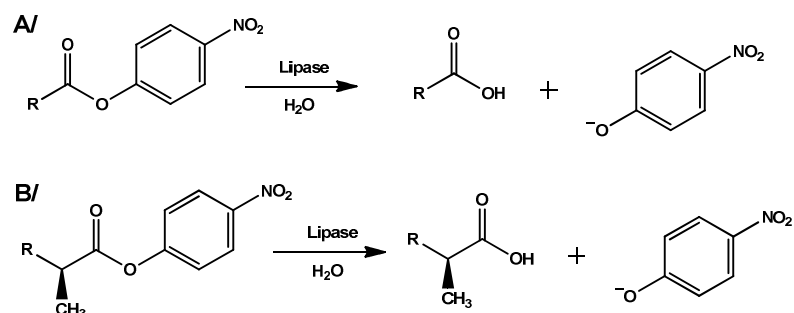


Figure 16 : Principe d'un test de criblage élaboré avec l'umbelliférone

Le principe de ce test a été validé dans un premier temps avec l'alcool déshydrogénase (ADH), avant d'être généralisé pour d'autres enzymes : l'oxydation de la fonction alcool en fonction cétone par l'ADH conduit à un composé qui va subir une réaction de  $\beta$ -élimination catalysée par la sérum albumine bovine (BSA) libérant ainsi la forme anionique de l'umbelliférone hautement fluorescente qui est proportionnelle à l'activité de l'enzyme (Figure 16)<sup>40</sup>. La BSA joue le rôle d'un catalyseur basique par l'intermédiaire des résidus lysine.

➤ Composés chromogéniques

Le nitrophénol, composé de couleur jaune est très souvent utilisé comme groupement partant coloré pour le criblage à haut-débit de banques de lipases et estérases issues de l'évolution dirigée. Les substrats de ces enzymes sont alors des esters du 4-nitrophénol préparés à partir de ce chromophore<sup>41</sup>. Le para-nitrophénol sera libéré et détecté par spectrophotométrie si la lipase mutée hydrolyse la liaison ester. Des esters optiquement actifs (Figure 17) peuvent également être utilisés pour déterminer l'énantiosélectivité des enzymes impliquées.



**Figure 17 : Principe du test utilisé pour le criblage des lipases**

Ces méthodes basées sur l'utilisation de substrats modifiés présentent l'avantage d'être plus directes que les méthodes faisant intervenir un chimiosenseur et d'offrir une bonne sensibilité surtout dans le cas de groupements fluorescents, mais elles présentent toutefois quelques inconvénients : (1) l'existence possible d'un « bruit de fond » dû à la libération du chromophore ou fluorophore selon un mécanisme non enzymatique ; (2) l'encombrement stérique du groupement chromogène ou fluorogène peut amener à isoler des enzymes présentant une spécificité qui est adaptée à ce type de substrat, l'affinité de l'enzyme pour son substrat réel (non modifié par ce groupement) peut être différente.

### **3.1.2. Méthodes spectrométriques**

Parmi les méthodes spectrométriques, la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire (RMN) sont les plus couramment utilisées. Dans certains cas elles peuvent être couplées avec la chromatographie chirale (GC ou LC). Les tests peuvent être réalisés avec les substrats réels de l'enzyme d'intérêt ou avec des substrats modifiés. Ces techniques permettent de mesurer l'énantiosélectivité des enzymes étudiées.

L'équipe de Reetz a développé une stratégie qui rend la spectrométrie de masse applicable à la détermination de l'énantiosélectivité (*ee* et/ou *E*) sans étape de séparation par chromatographie. Le principe est basé sur l'utilisation de substrats marqués par des isotopes qui se présentent sous forme de pseudo-énantiomères ou de composés prochiraux.

En ce qui concerne la RMN, l'élaboration récente d'appareils réalisant des « analyses RMN en flux » (flow-through NMR) permet actuellement d'utiliser cette technique d'analyse avec un haut débit. L'étude de l'énantiosélectivité d'une réaction enzymatique nécessite une étape de dérivatisation ou l'utilisation de pseudo-énantiomères ou composés prochiraux comme par exemple par un marquage au  $^{13}\text{C}$ <sup>42</sup>.

## **3.2. Méthodes de sélection basées sur la survie cellulaire**

Les méthodes de sélection basées sur la survie cellulaire présentent l'avantage de mettre en évidence les caractéristiques de l'enzyme recherchée *in vivo* sans avoir à analyser le contenu cellulaire. En effet, l'enzyme d'intérêt doit conférer à la cellule hôte une propriété essentielle à sa survie et permet ainsi d'éliminer tous les clones exprimant les enzymes ne présentant pas les propriétés recherchées.

Ces méthodes permettent de tester de façon rapide et efficace des bibliothèques allant de  $10^8$  à  $10^{10}$  clones alors que les tests de criblage se limitent à  $10^5$  clones. Cependant, la mise au point de ces méthodes de sélection est délicate puisqu'il faut relier de façon spécifique l'activité enzymatique recherchée et la survie de la cellule hôte. Dans certains cas, des voies métaboliques non désirées et non envisagées au départ peuvent conduire à la survie cellulaire sans requérir le concours de l'enzyme recherchée<sup>34</sup>.

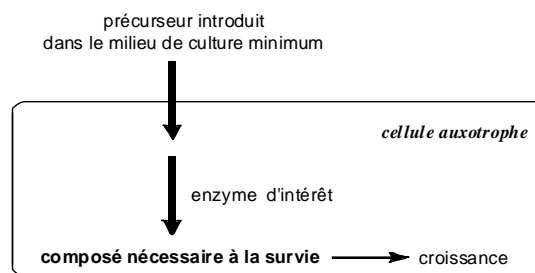
### **3.2.1. Sélection basée sur l'utilisation d'un élément essentiel ou toxique pour la cellule hôte**

Dans ce type de méthode, un élément essentiel ou toxique (ou un précurseur) est introduit dans le milieu de culture de la cellule hôte.

### 3.2.1.1. Sélection basée sur une complémentation métabolique ou un gain de fonction métabolique

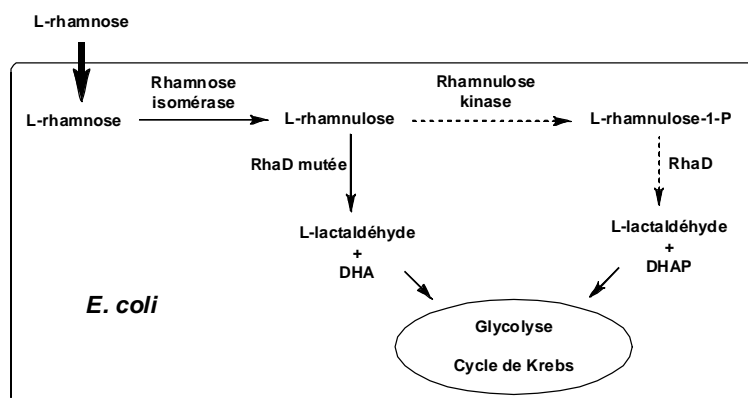
Cette stratégie est basée sur l'auxotrophie de la cellule hôte, c'est-à-dire l'incapacité d'un organisme à synthétiser un métabolite indispensable à sa survie. La construction de souches auxotrophes pour un composé (acide aminé, source de carbone, ...) peut être réalisée par la suppression de certaines voies métaboliques au sein de la cellule hôte : une ou plusieurs enzymes impliquées dans la biosynthèse de ce composé sont inactivées par délétion ou mutation des gènes correspondants. Les cellules auxotrophes ainsi obtenues seront utilisées pour le clonage des gènes mutés et l'expression des enzymes mutées correspondantes. Les cellules seront ensuite utilisées pour sélectionner les enzymes mutées.

Dans certains cas, un précurseur du composé nécessaire à la survie de l'organisme auxotrophe est introduit dans un milieu de culture minimum. L'enzyme mutée recherchée doit alors être spécifique de la transformation du précurseur en ce composé essentiel. Seules les cellules exprimant l'enzyme mutée recherchée sont capables de se développer (Figure 18).



**Figure 18 : sélection basée sur l'auxotrophie**

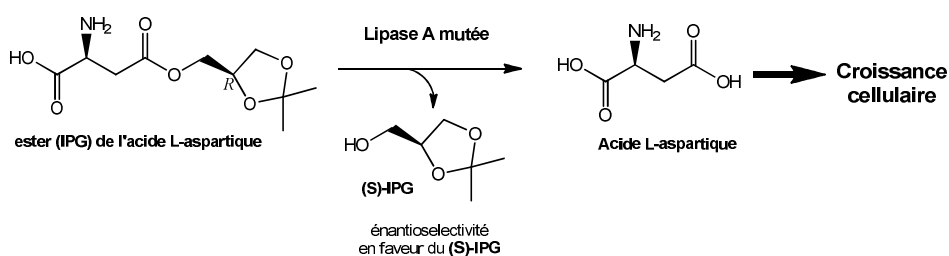
➤ Une telle stratégie a été développée dans le but de sélectionner des L-rhamnulose-1-phosphate aldolases mutées (RhaD) capable d'accepter le L-rhamnulose à la place du rhamnulose-1-P comme substrat (Figure 19).



**Figure 19 : Principe du test de sélection développé pour la L-rhamnulose aldolase<sup>43</sup>**

Dans ce cas, une auxotrophie a été générée par suppression des gènes de la cellule hôte (*E. coli*) codant pour deux enzymes, la rhamnulose kinase et la RhaD. Ces enzymes conditionnent la transformation de l'isomère du L-rhamnose, le L-rhamnulose, en L-lactaldéhyde et en dihydroxyacétone intermédiaires clés de la glycolyse et du cycle de Krebs, sans lesquels les cellules hôtes ne peuvent se développer. La source de carbone utilisée étant le L-rhamnose, la croissance des clones exprimant les RhaD mutées est donc conditionnée par leur aptitude à convertir le L-rhamnulose en L-lactaldéhyde et en dihydroxyacétone<sup>43</sup>.

➤ Un autre test basé sur l'auxotrophie a permis de sélectionner une lipase A de *Bacillus subtilis* dont l'énantiosélectivité a été inversée. Des cellules auxotrophes pour l'acide L-aspartique sont utilisées en présence de l'ester de configuration *R* (IPG) de l'acide L-aspartique comme substrat de la lipase. Ainsi, seuls les clones exprimant une lipase A mutée présentant l'énantiosélectivité recherchée pourront compenser leur auxotrophie par hydrolyse de l'ester en acide L-aspartique<sup>44</sup> (Figure 20).



**Figure 20 : Test de sélection pour l'inversion d'énantiosélectivité de la lipase A**

### 3.2.1.2. Apport d'un élément toxique

Une autre approche consiste à utiliser un composé qui normalement est toxique pour la cellule hôte. Si ce composé peut être transformé en un composé non toxique par l'enzyme mutée recherchée, seuls les clones exprimant cette enzyme pourront survivre.

➤ Cette démarche a été utilisée pour sélectionner des L-thréonine aldolases mutées ayant une activité catalytique plus efficace que l'enzyme sauvage. Cette enzyme catalyse une réaction d'aldolisation entre l'acétaldéhyde et la glycine. Les clones exprimant les enzymes mutés sont sélectionnés en présence d'acétaldéhyde (toxique pour la cellule hôte) et de glycine. Seuls les clones exprimant des aldolases ayant une activité capable de transformer une quantité suffisante d'acétaldéhyde pour rendre le milieu non toxique seront sélectionnés<sup>45</sup>.

➤ Les deux approches (auxotrophie et toxicité) peuvent également être combinées. Un test de sélection permettant de déterminer l'énantiosélectivité des lipases a été développé en utilisant comme source de carbone un mélange de deux esters de configurations opposées : l'hydrolyse de l'ester de configuration (*S*) conduisant à la production d'acide acétique utilisé



comme source de carbone par la cellule et l'hydrolyse de l'ester de configuration (*R*) conduisant à la production d'acide fluoroacétique, composé toxique pour la cellule. Une double sélection est ainsi mise en place et permet de favoriser la survie des clones exprimant une lipase énantiosélective envers les esters de configuration (*S*)<sup>46</sup> (Figure 21).

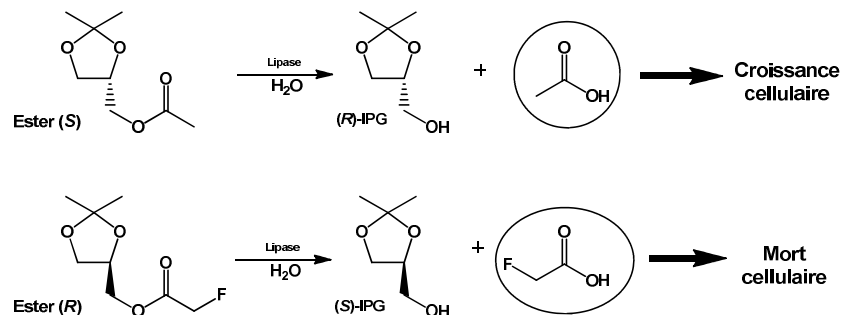


Figure 21 : "Double" sélection pour l'énantiosélectivité des lipases

### 3.2.1.3. Complémentation chimique

La complémentation chimique est une technique qui fait appel aux principes du criblage et de la sélection. Elle est basée sur l'utilisation d'un système dit « triple hybride » (yeast three-hybrid system) au sein de souches de *S. cerevisiae*<sup>47</sup>. Développé à l'origine pour étudier les interactions de type ligand-récepteur, ce système repose sur l'activation d'un gène rapporteur de la cellule hôte par un facteur de transcription artificiel constitué de deux protéines de fusion (issues de la fusion entre un récepteur (R<sub>A</sub> ou R<sub>B</sub>) avec respectivement un domaine de liaison à l'ADN ou un domaine d'activation) et d'une molécule hétérodimérique A-B permettant d'établir un pont entre ces deux protéines (Figure 22). Les protéines de fusion sont exprimées par la cellule hôte, tandis que la « molécule-pont » doit être introduite dans le milieu de culture.

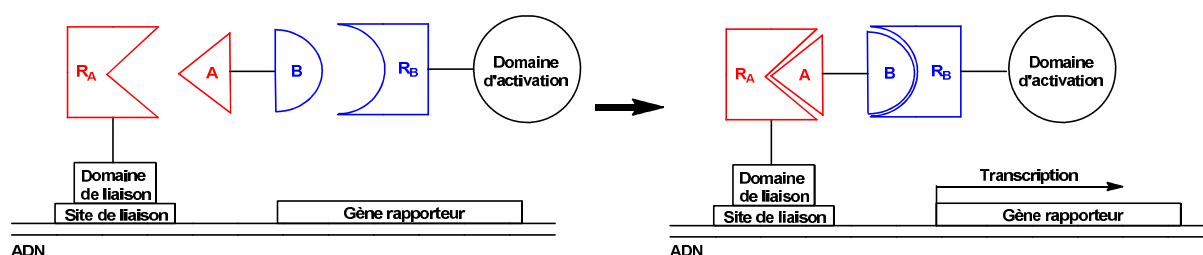
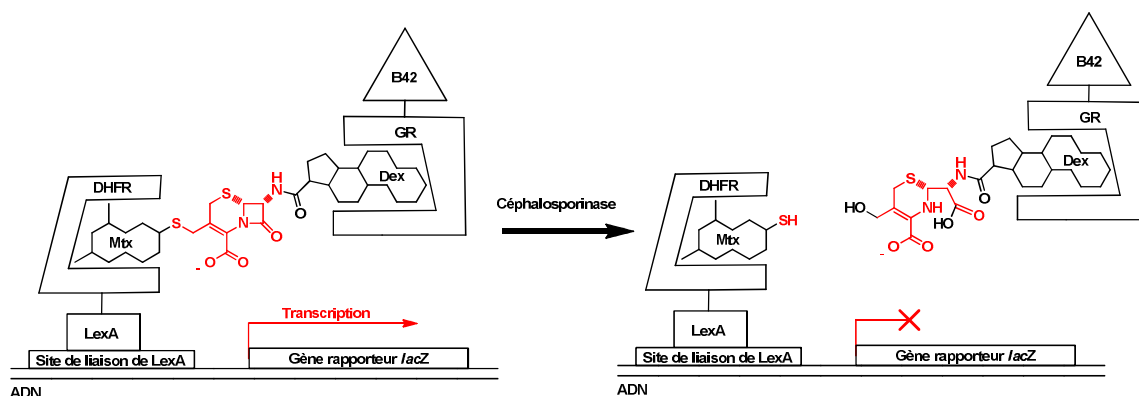


Figure 22 : Principe du système "triple hybride"

(R<sub>A</sub> = récepteur de la molécule A ; R<sub>B</sub> = récepteur de la molécule B)

Ce système a été exploité pour la mise en évidence d'activités enzymatiques. En effet, une première étude a été effectuée avec la céphalosporine<sup>48</sup> (enzyme de type β-lactamases). La « molécule-pont » utilisée comporte les composés Dex et Mtx liés par un motif de type

céphalosporine comme espacer. Une activité céphalosporinase provoque l'ouverture du cycle  $\beta$ -lactame qui entraîne une rupture de la liaison avec le Mtx (Figure 23)



**Figure 23 : Test par complémentation chimique pour l'activité céphalosporinase**

La libération du facteur de transcription artificiel conduit à une inactivation du gène rapporteur *lacZ* (codant pour la  $\beta$ -galactosidase). Ainsi, en présence de X-Gal (substrat chromogène de la  $\beta$ -galactosidase), seuls les clones exprimant une céphalosporinase active ne seront pas colorés (Figure 22).

Le développement de tests de sélection par complémentation chimique peut aussi impliquer un gène rapporteur essentiel ou toxique pour la cellule hôte. Ce principe a été utilisé pour sélectionner des enzymes telles que la glycosynthase<sup>49</sup> et la cellulase<sup>50</sup>.

Les tests de sélection basés sur la complémentation chimique peuvent être généralisés pour détecter l'activité de nombreuses enzymes en adaptant la « molécule-pont » et de plus une grande variété de gènes rapporteurs peut être utilisée. Cependant, cette stratégie concerne uniquement des enzymes qui catalysent la dimérisation ou le clivage du facteur de transcription.

### **3.3. Conclusion**

Bien que les tests de criblage soient de plus en plus spécifiques et sensibles, leur principale limitation demeure l'étape d'extraction des enzymes à partir des bibliothèques de clones (lorsqu'ils ne sont pas réalisables directement sur boîte d'agar). Les tests de sélection utilisés dans le cadre de l'analyse de banques d'enzymes mutés sont moins décrits dans la littérature par rapport aux tests de criblage car ils sont souvent plus délicats à mettre au point et nécessitent de construire des souches de microorganismes permettant de lier l'activité de l'enzyme à la survie cellulaire. Cependant lorsqu'ils sont efficaces, ils permettent d'analyser des bibliothèques de clones de taille importante. Leur développement est donc à l'heure actuelle un challenge.

## **4. Exemples de stratégies utilisées pour modifier des enzymes par mutagenèse**

### **4.1. Relations entre les positions des mutations et les propriétés des enzymes mutées**

Au fil des années, la littérature s'est enrichie d'une multitude d'exemples d'enzymes mutées dans le but d'améliorer leur performance. Actuellement, des études statistiques permettent d'étudier la distance des mutations par rapport au site actif en fonction des propriétés modifiées. Le but est de guider le choix de la (ou des) stratégie(s) apportant la diversité (aléatoires, rationnelles ou encore semi-rationnelles). Morley et al.<sup>51</sup> ont analysé leurs propres résultats et ceux d'autres groupes en se basant sur la distance entre un résidu clé du site actif (ou du centre asymétrique du substrat) et le C $\alpha$  de l'acide aminé muté. Il apparaît que les mutations au niveau des résidus directement en contact avec le substrat sont plus bénéfiques pour modifier la spécificité de substrat (l'énantiosélectivité et la stéréospécificité) et l'activité catalytique. Dans ce domaine, les méthodes rationnelles (mutagenèse dirigée) ou les méthodes semi-aléatoires (notamment le CASTing développée par Reetz *et al.*<sup>28</sup>) sont particulièrement efficaces.

En revanche, pour l'amélioration de la thermostabilité et la résistance aux solvants organiques la position des mutations ne semblent pas directement liées à leur distance du site actif<sup>53</sup>. Des méthodes aléatoires (recombinaison, PCR infidèle) qui statistiquement génèrent plus particulièrement des mutations éloignées du site actif seront donc privilégiées.

Nous allons indiquer quelques exemples récents d'enzymes dont la spécificité de substrat a été modifiée (domaine en relation avec le sujet de la thèse), choisis en fonction de l'intérêt des produits obtenus et des stratégies mises en œuvre.

### **4.2. Exemples d'amélioration et modification d'enzymes vis-à-vis de la spécificité de substrat**

Les enzymes sont particulièrement intéressantes pour produire des composés énantiomériquement purs. Cependant les applications synthétiques sont limitées par la spécificité et la sélectivité de certaines enzymes. Dans ce domaine les améliorations les plus spectaculaires sont obtenues par des méthodes de mutagenèse dirigée ou semi-aléatoire sur des résidus ou des séquences proches du site actif.

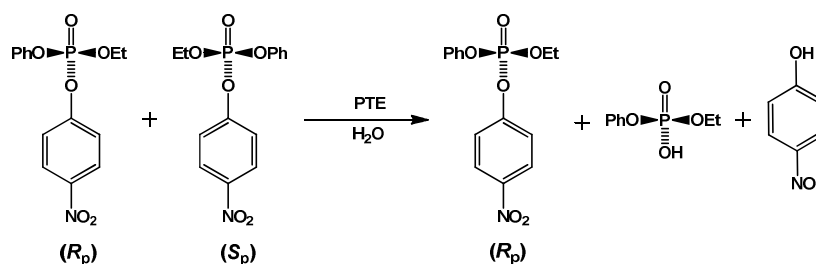
#### 4.2.1. Amélioration ou inversion de l'énantiosélectivité

L'amélioration ou l'inversion de l'énantiosélectivité des enzymes est un challenge dans le domaine de la biocatalyse. Parmi les enzymes dont l'énantiosélectivité a été modifiée, les lipases et estérases ont été les plus étudiées. D'autres résultats intéressants ont été obtenus avec une époxyde hydrolase d'*Aspergillus niger* et aussi avec une enzyme qui catalyse une réaction d'aldolisation, la KDPG aldolase. Quelques exemples choisis sont indiqués dans le Tableau 3.

Enzyme	Origine	Mutagenèse	Criblage / Sélection	Amélioration	Réf.
Phosphotriesterase	<i>Pseudomonas diminuta</i>	Cassette Mutagenesis	Criblage colorimétrique	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>E_{WT} = 21 / E_{G60A} = 11000</math></li> <li>• Enantiosélectivité inversée</li> </ul>	52
Epoxyde hydrolase	<i>Aspergillus niger</i>	CAST	Spectrométrie de masse	$E_{WT} = 4,6$ $E_{Mutée} = 115$	54
KDPG aldolase	<i>E. coli</i>	PCR infidèle	Criblage spectrophotométrique	Modification de la spécificité	36

**Tableau 3 : Exemples de modification d'énantiosélectivité de quelques enzymes.**

➤ La phosphotriesterase (PTE) de *Pseudomonas diminuta* catalyse l'hydrolyse d'une grande variété de composés de type organophosphates, comme par exemple des insecticides utilisés en agriculture ou des inhibiteurs de l'acétylcholine estérase (neurotoxiques). L'objectif est de créer des PTE mutées qui permettent d'améliorer son énantiosélectivité ( $E = 1$  à 90 en faveur de l'énantiomère *S* pour la PTE sauvage) et également de l'inverser.



**Figure 24 : Hydrolyse énantiosélective du *p*-nitrophényl-éthyl-phénylphosphate par la PTE**

La structure du site actif de la PTE a la particularité de présenter trois poches hydrophobes impliquées dans la liaison au substrat. Ces trois poches permettent d'orienter le substrat au sein du site actif : une petite poche (qui accommode le substituant le moins encombrant), une plus grande poche (qui accommode le substituant le plus encombrant) et une autre poche pour le groupe partant. Ainsi, la modification de la petite poche par une mutation ponctuelle Gly60Ala conduit à une augmentation de l'énantiosélectivité ( $E$ ) de 21 à 11000 en faveur de l'énantiomère *S* du *p*-nitrophényl-éthyl-phénylphosphate (Figure 24). Pour

la même enzyme, une inversion de l'énantiosélectivité a également pu être obtenue par différentes mutations au niveau de la grande et de la petite poche. Une PTE mutée de cette façon présente une énantiométrie (E) de 80 en faveur de l'énantiomère *R* du *p*-nitrophényl-éthyl-phénylphosphate<sup>55</sup>.

➤ L'époxyde hydrolase d'*Aspergillus niger* (ANEH) modifiée par mutagenèse selon la méthode « CAST » itératif a permis d'augmenter l'énantiosélectivité de 4,6 à 115 en faveur du (*S*)- phénylglycidyléther (Figure 25).

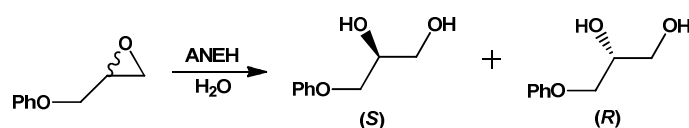


Figure 25 : Hydrolyse du phénylglycidyléther par l'époxyde hydrolase d'*A. niger*

L'ANEH a subi une série de 9 mutations au total situées à l'entrée du site actif. Ces positions ont été déterminées de façon rationnelle par étude de la structure 3D de l'enzyme<sup>28</sup>.

➤ Un autre exemple décrit par Wong et ses collaborateurs en présence d'une aldolase, la D-2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate aldolase (KDPG aldolase)<sup>36</sup> d'*E. coli* a pour objectif d'inverser l'énantiosélectivité. L'enzyme sauvage catalyse une réaction d'aldolisation entre le pyruvate et le D-glycéraldéhyde-3-phosphate (D-G3P) qui conduit au D-2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate. Après deux cycles de PCR infidèle et un cycle de « DNA shuffling », 1024 mutants ont été criblés à l'aide d'un test fluorimétrique. Une KDPG aldolase mutée a été sélectionnée pour sa capacité à catalyser une réaction d'aldolisation entre le pyruvate et le L-glycéraldéhyde qui conduit au L-2-hexulosonate avec un excès diastéréoisomérique supérieur à 90 % (Figure 26).

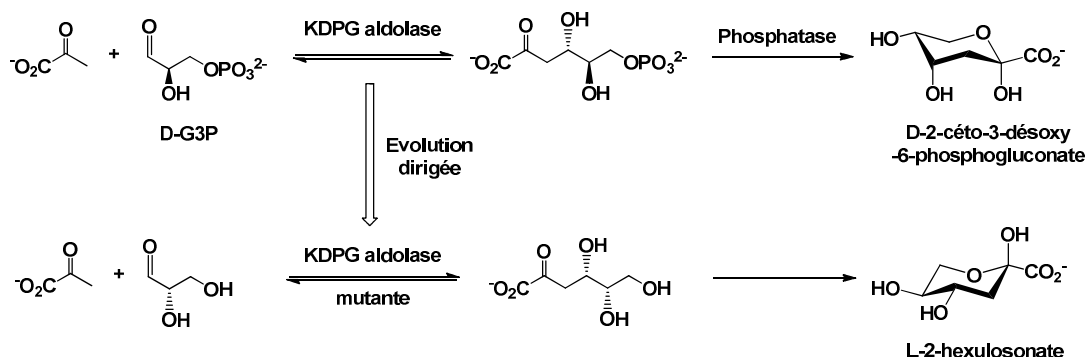


Figure 26 : Inversion de l'énantiosélectivité de la KDPG aldolase

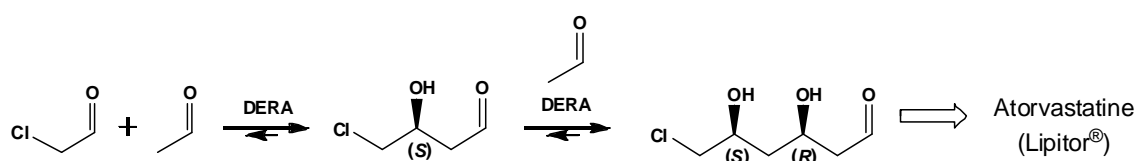
#### 4.2.2. Amélioration de l'affinité

De nombreux exemples notamment dans le domaine industriel ont permis d'améliorer l'affinité d'un substrat pour une enzyme par mutagenèse. Nous allons développer des travaux menés dans le domaine pharmaceutique en présence d'une aldolase (DERA) et d'une acylase (Tableau 4).

Enzyme	Origine	Mutagenèse	Criblage Selection	Amélioration	Réf.
DERA	<i>E. coli</i>	PCR infidèle	GC/MS	Meilleure affinité pour le chloroacétaldéhyde	53
glutaryl acylase	<i>Pseudomonas SY-77</i>	Saturation de site	Criblage fluorimétrique	Meilleure affinité pour l'adipyl-7-ADCA	54

**Tableau 4 : Exemples conduisant à l'amélioration de l'affinité vis-à-vis d'un substrat**

➤ Un exemple particulièrement significatif a été développé à l'échelle industrielle avec la 2-désoxy-D-ribose-5-phosphate aldolase (DERA) par la firme DSM. Cette enzyme catalyse la formation stéréospécifique de la liaison C-C selon une réaction d'aldolisation et elle peut être utilisée comme biocatalyseur pour la synthèse du (3*R*,5*S*)-6-chloro-2,4,6-tridésoxyhexapyranoside, un précurseur de la synthèse de composés de la famille de la vastatine tel que le Lipitor (atorvastatine, médicament anticholestérol le plus vendu).



**Figure 27 : Double aldolisation ("tandem aldol reaction") catalysée par la DERA**

Ce précurseur est obtenu grâce à la DERA selon une réaction tandem à partir de chloroacétaldéhyde et de deux équivalents d'acétaldéhyde (Figure 27). Cependant cette enzyme possède, d'une part, une faible affinité pour le chloroacétaldéhyde et, d'autre part, elle est rapidement inactivée par les fortes concentrations en aldéhyde utilisées à l'échelle industrielle. Selon une stratégie de criblage à haut-débit en présence de fortes concentrations de chloroacétaldéhyde, l'équipe de DSM a pu identifier des DERA mutées présentant des mutations bénéfiques (obtenues par PCR infidèle). La mutation Phe200Ile (le résidu Phe200 faisant partie d'une petite poche hydrophobe proche du site actif) combinée à une modification de la partie C-terminale de l'enzyme (Tyr259 C-terminale déletée ou substituée par un pentapeptide) a permis d'obtenir des mutants dix fois plus actifs que l'enzyme sauvage en présence d'acétaldéhyde (1M) et de chloroacétaldéhyde (500 mM). Ces conditions ont été

utilisées pour la synthèse du (3*R*,5*S*)-6-chloro-2,4,6-tridésoxyhexapyranoside à l'échelle industrielle<sup>53</sup>.

➤ Un autre exemple concerne la synthèse de l'acide 7-aminodésacétoxycéphalosporanique (7-ADCA) précurseur essentiel pour la préparation par voie semi-synthétique de nouvelles classes de pénicillines. La stratégie consiste à hydrolyser la chaîne latérale du cycle  $\beta$ -lactame d'une pénicilline naturelle et à la remplacer par la chaîne souhaitée (Figure 28).

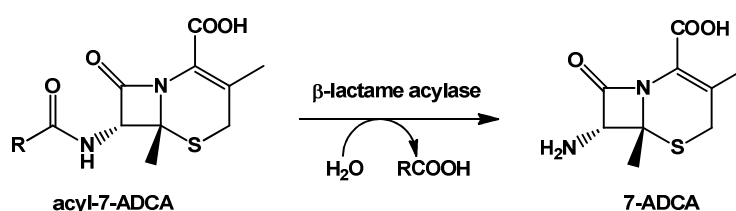


Figure 28 : Hydrolyse de la chaîne latérale d'une céphalosporine par une acylase

Dans ce but, une nouvelle glutaryl acylase de *Pseudomonas SY-77* a été obtenue par mutagenèse par saturation de site au niveau du résidu Asn266. En effet, ce résidu est connu pour son implication dans la spécificité de la glutaryl acylase vis-à-vis de la chaîne latérale des composés de type pénicilline<sup>55</sup>. Ainsi, l'enzyme mutée Asn266Met présente une spécificité vis-à-vis du 7-ADCA vingt fois supérieure à l'enzyme naturelle<sup>54</sup>.

## 5. Conclusion

Nous avons présenté les différentes techniques de mutagenèse, de criblage et de sélection utilisées actuellement pour améliorer ou modifier la spécificité de substrat des enzymes. Les très nombreux exemples récents décrits dans la littérature montrent que les techniques sont de plus en plus spécifiques et basées sur une connaissance très fine de la structure et du mécanisme des enzymes.

Nous allons maintenant nous intéresser à l'étude des propriétés de la TK qui fait l'objet de mes travaux de thèse. Nous nous attacherons aussi à faire le bilan des travaux visant à modifier cette enzyme par mutagenèse.

## CHAPITRE II : LA TRANSCETOLASE

Les monosaccharides sont des molécules complexes qui, en raison de leur multifonctionnalité et des carbones asymétriques, sont difficiles à obtenir par les procédés classiques de synthèse chimique. Le développement de procédés enzymatiques permettant d'accéder à ces composés en peu d'étapes par formation stéréospécifique de liaison C-C représente un enjeu majeur en synthèse organique.

Deux approches sont privilégiées actuellement pour catalyser la formation stéréospécifique de liaison C-C par voie enzymatique : des réactions d'aldolisation catalysées par des lyases et notamment les aldolases et des réactions de transfert d'un cétole sur une fonction aldéhyde catalysées par les transférases et ligases. Nous allons nous focaliser sur ce dernier type de réaction puisque la TK appartient à la classe des transférases.

### 1. Rôle de la TK *in vivo*

#### 1.1. Réaction catalysée *in vivo* par la TK

La TK (E.C. 2.2.1.1) est une transférase qui permet en une seule étape d'accéder à des cétoles de configuration *D-thréo* (3*S*,4*R*) par formation stéréospécifique d'une liaison C-C. *In vivo*, cette enzyme catalyse le transfert réversible d'un groupement hydroxyacétyle d'un cétole phosphate donneur sur un aldose phosphate accepteur (Figure 29). La réaction est stéréospécifique et la stéréochimie du carbone asymétrique formé est toujours *S*. Deux cofacteurs sont essentiels : le pyrophosphate de thiamine (ThDP) et un cation divalent comme  $Mg^{2+}$  ou  $Ca^{2+}$ .

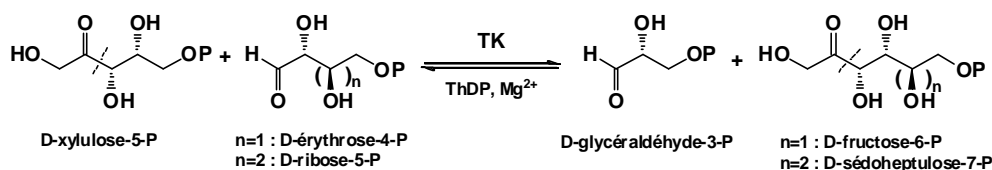


Figure 29 : Réaction catalysée *in vivo* par la TK

Le pyrophosphate de thiamine (ThDP) est la forme active de la vitamine B<sub>1</sub>. La molécule est constituée de trois domaines : le cycle 2-méthyl-4-aminopyrimidine (MAP), le cycle 4-méthyl-thiazolium (MT) et un groupement diphosphate (Figure 30). Le carbone 2 (\*) du cycle MT intervient directement dans le mécanisme catalytique de la TK qui sera développé ultérieurement.



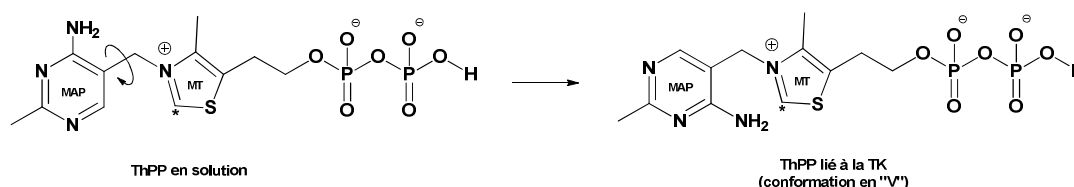


Figure 30: Structure et conformations du ThDP en solution dans l'eau

Le ThDP est utilisé comme cofacteur par d'autres enzymes catalysant la formation d'une liaison C-C la pyruvate déshydrogénase, la pyruvate décarboxylase, la pyruvate oxydase et la 1-désoxyxylulose-5-phosphate synthase.

## 1.2. Rôle de la TK chez les microorganismes et les organismes supérieurs

La TK est une enzyme présente chez tous les organismes qui utilisent la voie des pentoses phosphates et appartient au segment non oxydatif de cette voie métabolique (Figure 31).

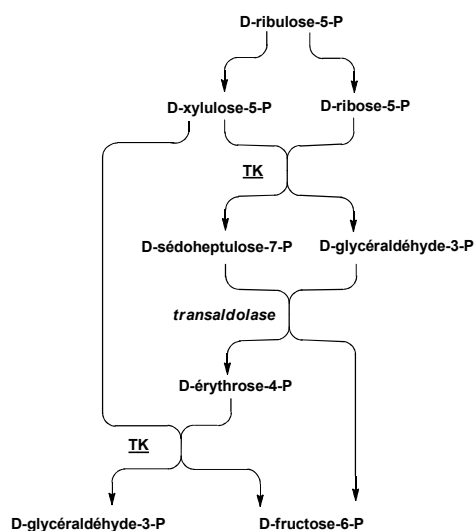


Figure 31 : Segment non oxydatif de la voie des pentoses phosphate

### 1.2.1. Rôle des intermédiaires du segment non-oxydatif de la voie des pentoses phosphates

Dans le segment non-oxydatif de la voie des pentoses phosphates, la TK catalyse la transformation du D-ribose-5-phosphate et du D-xylulose-5-phosphate en D-glycéraldéhyde-3-phosphate et D-sédoheptulose-7-phosphate ainsi que la transformation du D-érythrose-4-phosphate et du D-xylulose-5-phosphate en D-fructose-6-phosphate et D-glycéraldéhyde-3-phosphate. Chacun de ces monosaccharides phosphorylés joue un rôle essentiel comme précurseurs de différentes voies métaboliques (Figure 32).

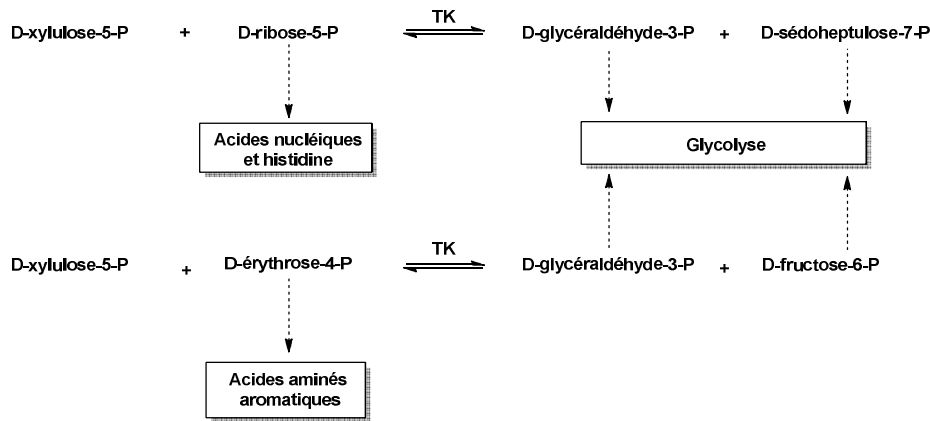


Figure 32 : Importance de la TK dans la cellule

➤ Le D-ribose-5-phosphate généré par la voie des pentoses phosphates est phosphorylé par la ribose phosphate pyrophosphokinase en présence d'une molécule d'ATP pour donner le 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate (PRPP). Ce précurseur est impliqué dans la biosynthèse de l'histidine, des nucléotides et du nicotinamide adénine dinucléotide ( $\text{NAD}^+$ ) (Figure 33).

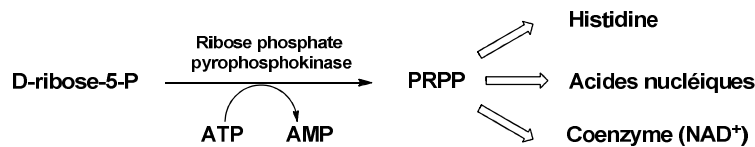


Figure 33 : Implication du D-ribose-5-phosphate dans trois voies métaboliques

➤ Le D-érythrose-4-phosphate est impliqué dans la synthèse des acides aminés aromatiques<sup>90</sup> (sauf chez certaines archéobactéries). L'étape initiale est la condensation du D-érythrose-4-phosphate et du phosphoénolpyruvate (PEP) pour donner un cycle à 7 carbones. Un intermédiaire commun aux voies métaboliques de ces trois acides aminés aromatiques est ainsi obtenu : c'est le chorismate. La phénylalanine et la tyrosine sont produites à partir du préphénate alors que le tryptophane est obtenu à partir de l'anthranilate (Figure 34).

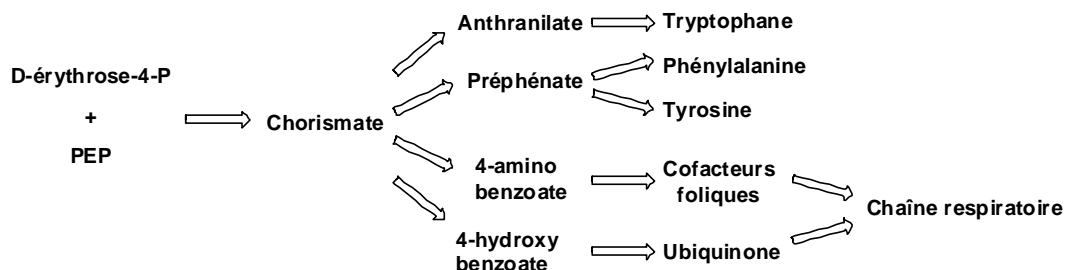
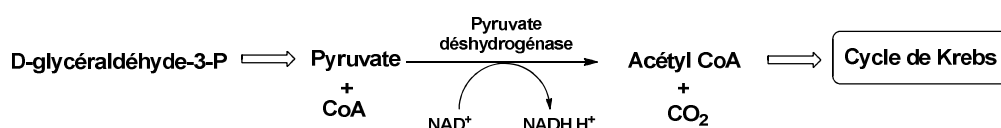


Figure 34 : Voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques

Le chorismate permet également la synthèse du 4-aminobenzoate et du 4-hydroxybenzoate, respectivement précurseurs des cofacteurs foliques et de l'ubiquinone (composants de la chaîne respiratoire).

➤ Le D-fructose-6-phosphate et le D-sédoheptulose-7-phosphate permettent de faire un lien entre la voie des pentoses phosphates et la glycolyse. Le D-fructose-6-phosphate et le D-sédoheptulose-7-phosphate sont phosphorylés par la phosphofructokinase 1 (PFK1) en présence d'ATP pour accéder au D-fructose-1,6-bisphosphate et au D-sédoheptulose-1,7-diphosphate. Le D-sédoheptulose-7-phosphate est aussi un précurseur des lipopolysaccharides des parois bactériennes.

➤ Enfin, le D-glycéraldéhyde-3-phosphate est précurseur de l'acétyl coenzyme A (Acétyl CoA) impliqué dans le cycle de Krebs. En effet, le D-glycéraldéhyde-3-phosphate obtenu peut entrer dans la voie de la glycolyse et permettre d'accéder au pyruvate. Le pyruvate est décarboxylé par la pyruvate déshydrogénase pour donner l'acétyl CoA (Figure 35).



**Figure 35 : Implication du D-glycéraldéhyde-3-phosphate dans la synthèse de l'acétyl CoA, précurseur du cycle de Krebs**

### **1.2.2. Implication de la TK dans des pathologies chez l'homme**

#### **➤ Maladies neurologiques**

Ces différents monosaccharides phosphorylés, substrats de la TK, sont donc impliqués dans de nombreuses voies métaboliques. Il a été montré qu'un dysfonctionnement de la TK chez les organismes supérieurs et notamment chez l'Homme peut engendrer des maladies sévères comme le syndrome de Wernicke-Korsakoff. Cette maladie est provoquée par une moins bonne affinité de la TK pour son cofacteur, le pyrophosphate de thiamine<sup>56</sup>. Ce syndrome génère des paralysies des muscles moteurs et des troubles de la conscience.

La déficience de l'activité de la TK a également été proposée dans le cadre de la maladie d'Alzheimer. En effet, les personnes atteintes par cette maladie présente une faible activité de la TK. Cette anomalie serait due à une protéolyse partielle de la TK par des cystéines protéinases<sup>57</sup>.

### ➤ Cancer

Une déficience en thiamine est souvent présente chez les personnes souffrant d'un cancer avancé. Ceci est dû à une mobilisation excessive de la thiamine par les cellules cancéreuses<sup>58</sup>. Des expérimentations menées sur la souris, ont permis de montrer qu'une augmentation de la quantité de thiamine présente dans l'alimentation<sup>59</sup> conduit à une augmentation de la prolifération des tumeurs cancéreuses. Cette découverte a conduit au développement d'analogues du ThDP inhibiteurs de la TK dans le but de ralentir la production de ribose-5-phosphate et donc la réplication. Ces inhibiteurs (Figure 36) présentent des modifications au niveau du cycle 4-aminopyridine (oxythiamine, N3'-pyridyl-thiamine) ou du cycle thiazolium (thiamine thiazolone, déazathiamine). L'oxythiamine pyrophosphate stoppe en phase G<sub>1</sub> le cycle cellulaire de certaines cellules tumorales d'Ehrlich implantées chez la souris. Les autres molécules présentées dans la Figure 36 ont une action inhibitrice sur l'activité de la TK, mais ne semble pas avoir d'effet anti-prolifératif probant. Ceci semble lié à des problèmes d'assimilation et de transport cellulaire de ces composés<sup>60</sup>.

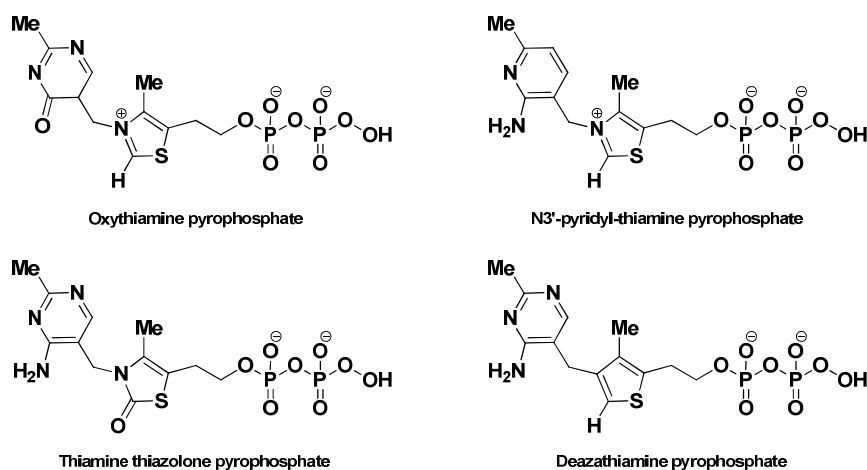


Figure 36 : Exemples d'analogues du ThPP inhibiteurs de la TK

### 1.2.3. Rôle de la TK chez les végétaux

Chez les végétaux, la TK intervient dans le cycle de Calvin. En effet, les végétaux sont des organismes autotrophes. Les glucides peuvent être entièrement élaborés à partir de l'eau et du CO<sub>2</sub>. Cette séquence de réactions constitue le cycle de Calvin qui débute par une étape catalysée par la D-ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxydase. Cette réaction permet l'assimilation du CO<sub>2</sub> en présence du D-ribulose-1,5-bisphosphate dont le précurseur est le D-ribose-5-phosphate qui est régénéré par la TK et l'aldolase (Figure 37). Il est à noter que dans les cellules photosynthétiques 75 à 90 % de la TK est associée aux chloroplastes.

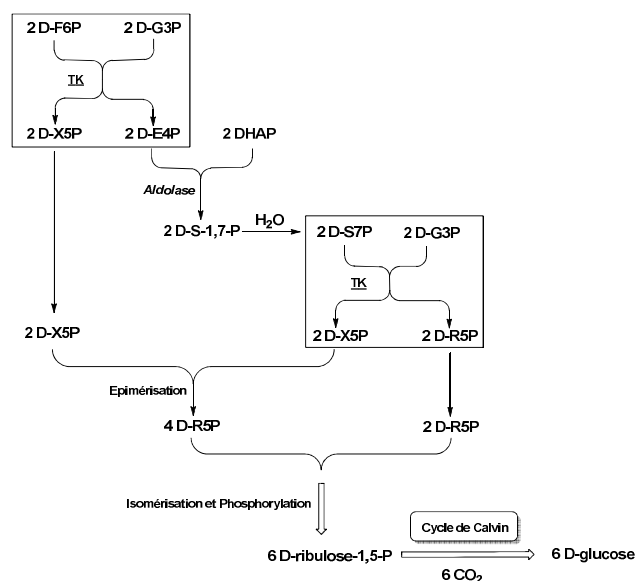


Figure 37 : Rôle de la TK dans la régénération du D-ribulose-5-phosphate impliqué dans le cycle de Calvin

## 2. Séquençage et surexpression des TK

De nombreuses études décrivent la purification de TK et le séquençage des gènes correspondants provenant de microorganismes, de plantes mais aussi d'organismes supérieurs. Seuls quelques uns des gènes ont été surexprimés afin de faciliter la production et la purification des TK dans l'optique de leur cristallisation (paragraphe 3).

### 2.1. Séquençage

Le séquençage des gènes codant pour les TK de levures (*S. cerevisiae*<sup>61</sup>, *Hansenula polymorpha*<sup>62</sup>, *Pichia stipitis*<sup>63</sup>, ...), d'autres eucaryotes unicellulaires (*Leishmania mexicana*<sup>64</sup>, *Plasmodium falciparum*<sup>65</sup>), de bactéries (*E. coli*<sup>66</sup>, *Rhodobacter sphaeroides*<sup>67</sup> et *capsulatus*<sup>68</sup>, *Xanthobacter flavus*<sup>69</sup>, *Alcaligenes eutrophus*<sup>70</sup>, *Haemophilus influenzae*<sup>71</sup>, ...), de plantes (*Craterostigma plantagineum*<sup>72</sup>, maïs<sup>73</sup>, épinard, pomme de terre, ...), mais aussi d'organismes supérieurs (Homme<sup>74</sup>, rat<sup>75</sup>, souris<sup>76</sup>, ...) montrent une forte homologie des séquences protéiques.

En effet, l'alignement de 22 séquences protéiques de TK issues de différents organismes (mammifères, plantes, bactéries, levures) a permis de mettre en évidence 50 résidus totalement invariants, auxquels s'ajoutent 24 résidus qui diffèrent seulement entre les mammifères et les autres organismes. Certains résidus sont impliqués dans la structure du site actif<sup>77</sup>. Une étude plus précise de la fonction de ces résidus conservés est faite dans le paragraphe 3.3.

## **2.2. Surexpression et purification des TK**

### **2.2.1. TK de levure**

Deux gènes codant des enzymes ayant une activité TK, *TKL1* et *TKL2*, ont été identifiés chez *S. cerevisiae*. Les deux enzymes correspondantes présentent 71 % d'homologie de séquence mais semblent jouer des rôles différents au sein de la cellule. En effet, le gène *TKL2* est peu exprimé et ne semble pas indispensable au métabolisme de *S. cerevisiae*<sup>78</sup> contrairement à la TK codée par le gène *TKL1*. Tous les travaux décrits dans la littérature concernent la TK codée par gène *TKL1*.

La TK de levure a été la première à avoir été clonée et surexprimée. Sundstorm et ses collaborateurs ont isolé le plasmide pTKL1, contenant le gène *TKL1*, à partir d'une banque génomique de *S. cerevisiae* dans le vecteur pHR81<sup>79</sup>. Ce vecteur navette a la particularité de se répliquer dans *E. coli* et dans *S. cerevisiae*. Grâce à l'utilisation de ce vecteur, les auteurs obtiennent un taux de surexpression de la TK qui représente 15% de la quantité de protéines cellulaires.

Une méthode de purification de la TK produite dans *S. cerevisiae* H402 (pTKL1) est décrite par l'équipe de Schneider<sup>80</sup>. Elle fait intervenir successivement une précipitation au sulfate d'ammonium, trois chromatographies d'exclusion moléculaire (Sephadex G-25, Sephacryl S-300 et Sephadex G-50) et une chromatographie sur résine anionique (Mono-Q HR). Cette méthode permet d'obtenir la TK avec une activité spécifique de 37 U.mg<sup>-1</sup> avec un rendement de 32 % (Tableau 5).

Purification	Activité spécifique (U.mg <sup>-1</sup> )*	Rendement en %
Extrait brut	5,9	100
Précipitation au (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6,1	85
Sephacryl S-300	18	61
Mono-Q HR	37	32

(\* : Une unité U est définie comme 1 µmol de D-glycéraldéhyde-3-phosphate formée par minute)

**Tableau 5 : Purification de la TK de *S. cerevisiae***

### **2.2.2. TK de *E. coli***

Deux gènes *tktA* et *tktB* ont été identifiés chez *E. coli*. Les séquences protéiques des deux TK présentent 70 % d'homologie. La TK issu du gène *tktA* est l'enzyme la plus exprimée dans *E.coli* et aussi la plus étudiée. Woodley et ses collaborateurs ont cloné le gène *tktA* dans un plasmide multicopie de type pBGS18 portant un gène de résistance à la kanamycine. Après transformation dans *E. coli*, des cultures à grande échelle (20 et 1000

litres) en réacteur ont été réalisées afin de produire la TK. La lyse des bactéries par un homogénéisateur haute-pression a permis d'obtenir un extrait cellulaire clarifié avec une activité de  $230 \text{ U.mL}^{-1}$  dans lequel la TK représente 40 % de la quantité de protéines<sup>81</sup>.

La purification des protéines a été facilitée par le greffage d'une queue six histidines (His-Tag) en position N-terminale. Cet oligopeptide présente une grande affinité pour le nickel et a permis de purifier la TK par chromatographie d'affinité sur une résine Ni-NTA (nickel-acide nitriloacétique)<sup>82</sup>.

### **2.2.3. TK de *L. mexicana***

Le gène de la TK de *L. mexicana* a également été clonée dans un vecteur sous le contrôle d'un promoteur T7 et d'un opérateur *lacZ*, avec une étiquette six histidines. Après transformation dans *E. coli* et induction par l'IPTG, la TK représentait 5 à 8 % des protéines de l'extrait cellulaire issu de la culture. Une chromatographie d'affinité sur résine Ni-NTA a permis d'obtenir une TK avec une activité spécifique de  $1,65 \text{ U.mg}^{-1}$  et un rendement de 10 à 15 mg par litre de culture<sup>64</sup>.

### **2.2.4. TK de maïs**

Le gène de la TK de maïs (*Zea mays*) a été clonée et la protéine produite sous forme de protéine de fusion avec un domaine thioredoxine afin de remédier à une faible surexpression du gène seul dans *E. coli*. Exprimée sous le contrôle d'un promoteur T7 et d'un opérateur *lac*, cette protéine de fusion se compose d'une étiquette six histidines, d'un domaine thioredoxine, d'un site de clivage pour la thrombine et du gène de la TK de maïs. Après transformation et surexpression dans *E. coli*, la protéine de fusion a été purifiée sur colonne Ni-agarose, puis soumise à un traitement par la thrombine afin de cliver la protéine de fusion. Après cette étape de clivage, la TK de maïs a été purifiée sur une colonne Superdex 200. La TK de maïs a été obtenue avec une activité spécifique de  $25,3 \text{ U.mg}^{-1}$  et un rendement de 87 % (Tableau 6)<sup>73</sup>.

Purification	Activité spécifique ( $\text{U.mg}^{-1}$ ) *	Rendement en %
Extrait brut	6,0	100
Ni-agarose	10,2	89
Superdex 200	25,3	87

(\* : une unité U est définie comme 1  $\mu\text{mol}$  de D-glycéraldéhyde-3-phosphate formée par minute)

**Tableau 6 : Purification de la TK de maïs (*Zea mays*)**

### 2.2.5. TK humaine

La TK humaine a été clonée tout d'abord par Wang et ses collaborateurs<sup>83</sup> dans un vecteur de surexpression sous le contrôle d'un promoteur T7 et d'un opérateur lacZ, avec une étiquette six histidines en position N-terminale. Cette stratégie a conduit après purification à une activité spécifique de 6 à 10 U.mg<sup>-1</sup> et un rendement de 0,8 à 1,5 mg par litre de culture. Plus récemment, Nixon et ses collaborateurs ont utilisé le vecteur pCL476 qui a permis aussi l'introduction d'une étiquette HisTag. Le promoteur est inducible par la chaleur. Le vecteur pCL476/TK a été transformé dans une souche d'*E. coli*. La souche obtenue a été cultivée à 30 °C, puis la production de la TK a été induite en plaçant la culture à 42 °C. Après purification par chromatographie sur hydroxyapatite, suivie d'une chromatographie d'affinité au nickel (Tableau 7), la TK recombinante humaine exprimée dans *E. coli* a été obtenue avec une activité spécifique de 13,5 U.mg<sup>-1</sup> et un rendement de 2,5 %<sup>84</sup>.

Purification	Activité spécifique (U.mg <sup>-1</sup> )	Rendement en %
Extrait brut	0,10	100
Hydroxyapatite	0,33	9
Ni-IDA-Sépharose	13,5	2.5

Tableau 7 : Purification de TK humaine recombinante issue de *E. coli*

## 3. Etude cristallographique des TK

### 3.1. Structures tridimensionnelles

Les structures tridimensionnelles des TK de *S. cerevisiae*, *E. coli*, *L. mexicana*, et du maïs ont été résolues en présence des cofacteurs seuls mais aussi en présence de certains substrats donneurs ou accepteurs (Tableau 8).

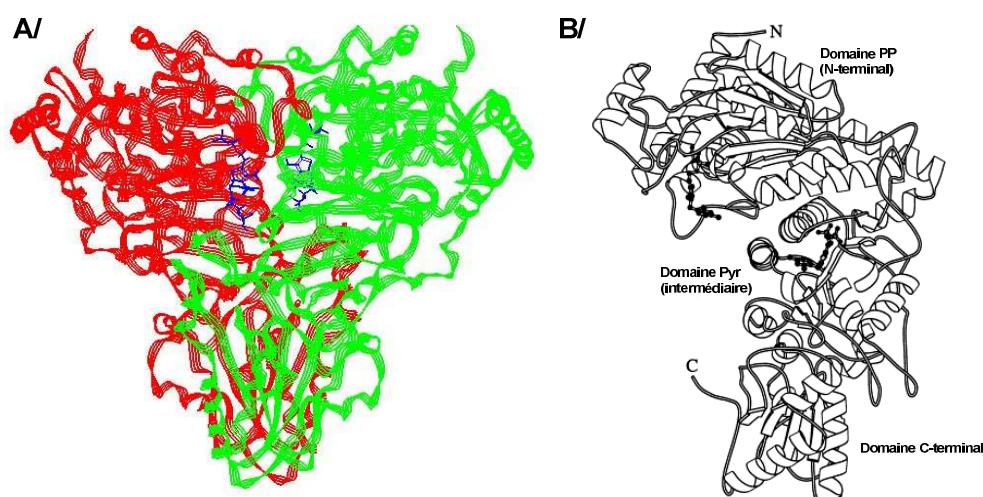
Source	Structure	Résolution	Monomère		Co-cristallisée avec :		Ref.
			PM (en kDa)	Nombre d'acides aminés	Substrat donneur	Substrat accepteur	
<i>S. cerevisiae</i>	Dimère	2 Å	74	680	Erythrose-4-P	-	85
		1,86 Å			Hydroxypyruvate	-	86
<i>E. coli</i>	Dimère	1,47 Å	72	664	-	Xylulose-5-P	87
		1,65 Å			-	Fructose-6-P	
		1,60 Å			Ribose-5-P	-	
<i>L. mexicana</i>	Dimère	2,22 Å	71,8	671	ThDP / MgCl <sub>2</sub>		64
Maïs	Dimère	2,30 Å	72,99	675	ThDP / MgCl <sub>2</sub>		73

Tableau 8 : Structures cristallines de TK



La structure 3D de la TK de *S. cerevisiae* a été la première à avoir été déterminée en présence de ses cofacteurs par diffraction de rayons X par l'équipe de Schneider avec une résolution de 2 Å en 1994<sup>85</sup>. Cette enzyme est constituée de deux sous-unités identiques de 74 kDa comportant chacune 680 acides aminés (Figure 38 A).

Chaque monomère est caractérisé par 3 domaines distincts (Figure 38 B) : le domaine N-terminal (du résidu 1 au résidu 322), le domaine intermédiaire (du résidu 323 au résidu 538) et le domaine C-terminal (du résidu 539 au résidu 680). Le domaine N-terminal (domaine PP) et le domaine intermédiaire (domaine Pyr) sont impliqués dans la stabilisation du dimère (Glu<sup>162</sup> interagissant avec Glu<sup>418</sup> et Glu<sup>167</sup> de l'autre sous-unité<sup>88</sup>) et englobent également les deux sites actifs. Chaque monomère comporte un site actif qui est situé à l'interface entre les deux sous-unités et deux sites de fixation pour le ThDP et le cation divalent Mg<sup>2+</sup> ou Ca<sup>2+</sup> localisés à proximité du site actif. Aucune implication dans la catalyse enzymatique n'a été démontrée pour le domaine C-terminal.



**Figure 38 : Structure de la TK (A : structure de l'homodimère ; B : les trois domaines d'un monomère)**

Les structures d'autres TK ont été résolues plus récemment : TK de *L. mexicana* (2003), du maïs (2004), de *E. coli* (2007), de *B. anthracis* (publication en cours). Elles se présentent toutes sous forme de dimère avec des nombres d'acides aminés et des PM très proches. De plus, elles comportent également un site actif pour chaque sous-unité situé à l'interface entre les deux monomères.

Les résidus du site actif ont été identifiés et leur rôle dans la catalyse et la reconnaissance des substrats a été étudié par mutagenèse dirigée. Les travaux exposés ci-dessous ont été principalement réalisés avec la TK de levure. Des résultats récents, obtenus avec la TK d'*E. coli* et avec la TK humaine, montrent de fortes analogies avec la TK de levure.

### 3.2. Etude du site actif de la TK en présence des cofacteurs

La TK a été également co-cristallisée en présence de ses cofacteurs, le  $\text{Ca}^{2+}$  et ThDP<sup>89</sup>. Des études cristallographiques couplées à des expériences de mutagenèse dirigée ont permis de proposer des interactions entre les résidus du site actif de la TK de levure et les cofacteurs (Figure 39).

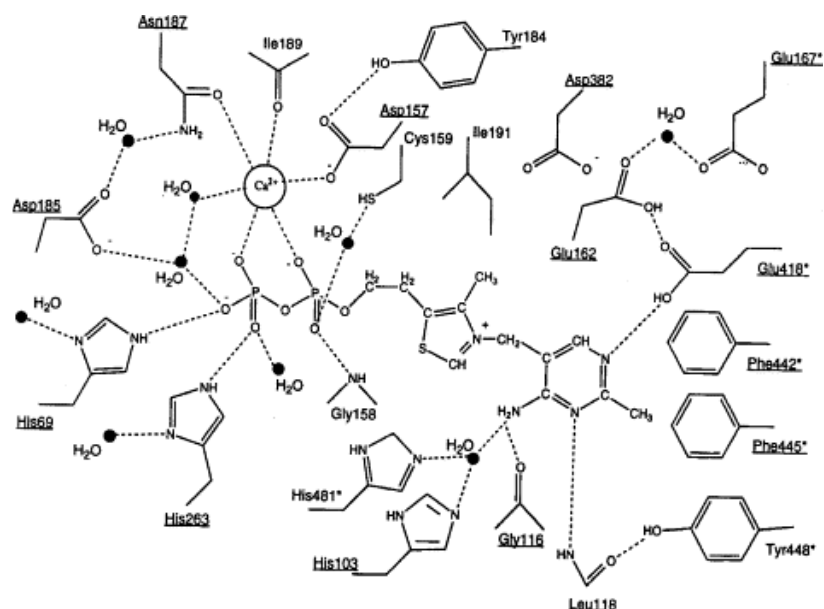


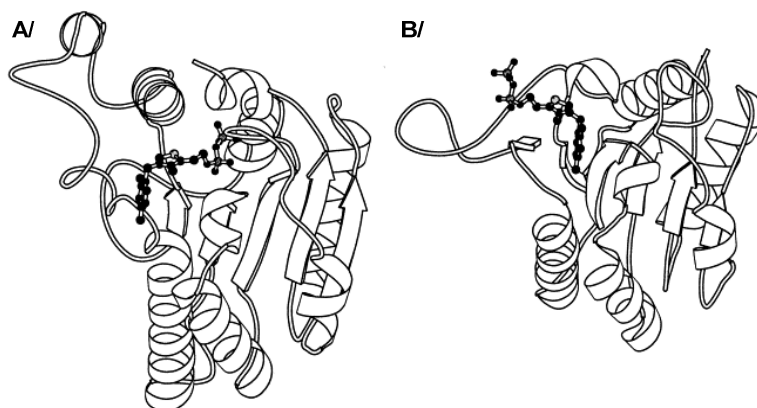
Figure 39 : Interactions entre les cofacteurs et les résidus du site actif de la TK  
(les résidus conservés sont soulignés et les résidus de l'autre unité sont désignés par une astérisque)

#### 3.2.1. Etude du site actif en présence de ThDP

Le ThDP est enchâssé dans une cavité profonde qui est située à l'interface des deux sous-unités protéiques. Son groupement diphosphate interagit avec le cation  $\text{Ca}^{2+}$ , 3 molécules d'eau et 3 résidus (His69, His263 et Gly158). Le cycle thiazolium du ThDP, quant à lui, forme des liaisons de type de Van Der Waals avec certains résidus du site actif. Le résidu Asp382 intervient dans la stabilisation de la charge du cycle thiazolium et est indispensable à la liaison du ThPP à l'enzyme<sup>88</sup>. Le cycle 4-aminopyrimidine est stabilisé dans la zone hydrophobe par les résidus Phe445 et Tyr448.

Il a été montré que d'autres enzymes qui utilisent le ThDP telles que la pyruvate oxydase<sup>90</sup> et la pyruvate décarboxylase<sup>91</sup> présentent une zone de reconnaissance du ThDP analogue à celle de la TK. Ce motif est constitué d'un feuillet  $\beta$  parallèle à 5 brins et de deux hélices situées de part et d'autre du feuillet (Figure 40). Dans le cas de la TK, le groupement diphosphate du ThDP interagit avec le feuillet  $\beta$  d'un monomère tandis que le cycle 4-aminopyrimidine interagit avec le feuillet  $\beta$  de l'autre monomère ; le cycle thiazolium, quant à lui, interagit avec les deux feuillets  $\beta$ . Il a été montré que la présence de ThDP au sein de

l'enzyme modifie sa conformation. En effet, le ThDP induit une conformation plus compacte et rend ainsi l'enzyme plus stable. Ceci semble être dû à la stabilisation de deux boucles (chaque boucle étant située sur une des sous-unités de l'enzyme) correspondant aux résidus 187 à 198 (situés dans le domaine N-terminal, PP) et 383 à 394 (situés dans le domaine intermédiaire, Pyr)<sup>92</sup>.



**Figure 40 : Motif structural du site de fixation au ThDP**  
(A : dans le domaine PP ; B : dans le domaine Pyr)

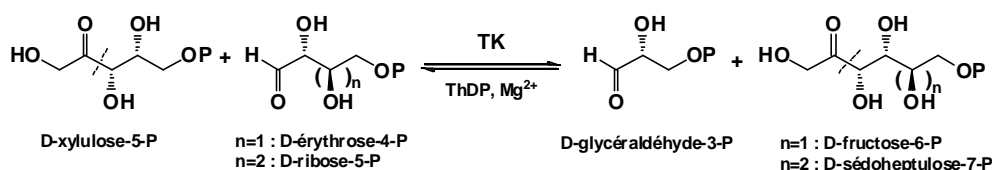
### 3.2.2. Etude du site actif en présence des cations divalents

Hawkins et ses collaborateurs ont découvert un motif structural identique -GDG-X<sub>(27)</sub>-NN- chez les enzymes utilisant le ThDP comme cofacteur<sup>93</sup>. La première étude tridimensionnelle de la TK de *S. cerevisiae*<sup>85</sup> a suggéré que ce même motif (-GD<sub>157</sub>G-X<sub>(26)</sub>-D<sub>185</sub>XN<sub>187</sub>-) était impliqué dans la fixation de l'ion divalent Ca<sup>2+</sup>.

Les données cristallographiques montrent que le cation divalent Ca<sup>2+</sup> forme des liaisons hydrogène avec les acides aminés Asp157, Asp185, Asn187 et Ile189 du site actif et interagit également avec le groupement diphosphate du ThDP. Sa présence est essentielle pour que le ThDP se lie à l'apoenzyme (Figure 39).

### 3.3. Etude du site actif de la TK en présence de ses substrats

L'étude du site actif de la TK de levure en présence de ses substrats a fait l'objet de nombreux travaux. Récemment, des premiers résultats ont été publiés avec la TK de *E. coli* montrant de très fortes homologies avec le site actif de la TK de levure.



**Figure 41 : Réaction catalysée in vivo par la TK**

### 3.3.1. Cristallisation de la TK de *S. cerevisiae* en présence du D-érythrose-4-phosphate

Comme nous l'avons indiqué précédemment, la TK accepte des cétooses et des aldoses phosphates comportant 3 à 7 carbones. Parmi eux, seul le D-érythrose-4-phosphate (un des substrats accepteurs) a été co-cristallisé avec la TK de *S. cerevisiae* avec une résolution de 2,4 Å<sup>94</sup>. Les substrats donneurs n'ont pas pu être co-cristallisés en raison d'un manque de stabilité dans le site actif au cours de la cristallisation de l'enzyme.

Les études cristallographiques couplées à des expériences de mutagenèse dirigée ont permis de proposer un modèle des interactions entre les résidus du site actif et le D-érythrose-4-phosphate (Figure 42).

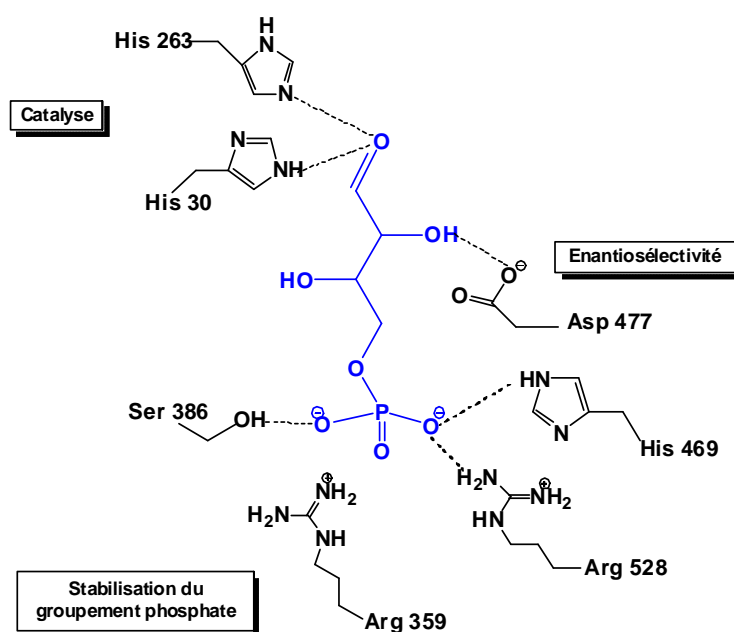
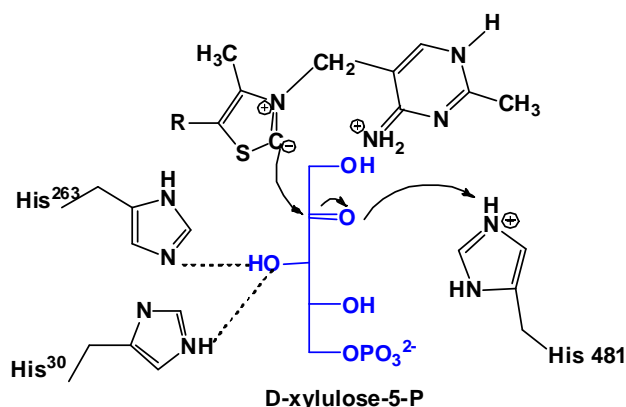


Figure 42: Mise en évidence des acides aminés du site actif de la TK de *S. cerevisiae* impliqués dans la fixation du substrat accepteur (Erythrose-4-P) et dans la catalyse

Le rôle des résidus indiqués dans la Figure 42 a été déterminé d'après les données cristallographiques et par diverses études de mutagenèse dirigée en présence des substrats donneurs et accepteurs naturels de la TK et aussi d'analogues.

#### ➤ Rôle des His 30 et 263 vis-à-vis de la réaction catalysée par la TK<sup>94</sup>

Une étude cinétique réalisée en présence du D-xylulose-5-P (substrat donneur naturel) et du D-ribose-5-P (substrat accepteur naturel) a montré que les mutations His30Ala et His263Ala diminuent fortement les valeurs des  $k_{cat}$ . Ces deux résidus participent au mécanisme catalytique (Figure 43).



**Figure 43 : Interaction entre les His 30 et 263 et le D-xylulose-5-phosphate**

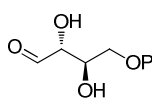
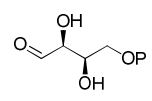
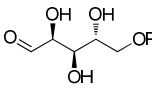
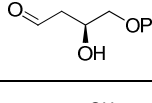
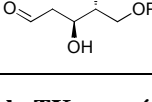
D'après les données cristallographiques, l'His263 possède un atome d'azote non protoné qui pointe vers le groupement hydroxyle du C<sub>3</sub> du substrat donneur. Ce résidu arracherait le proton, ce qui conduirait à la rupture de la liaison C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> de ce substrat. Quant à l'His30, il a été montré que la valeur du K<sub>m</sub> de la TK His30Ala est beaucoup plus élevée que celle de la TK His263Ala et notamment vis-à-vis du D-xylulose-5-P. Le résidu His30 serait donc plus fortement impliqué dans la reconnaissance du substrat donneur. Compte tenu des données cristallographiques, l'His30 positionnerait correctement le D-xylulose-5-P dans le site actif pour faciliter la déprotonation réalisée par l'His263 (Tableau 9).

Enzyme	k <sub>cat</sub> (s <sup>-1</sup> )	K <sub>m</sub> (μM)	
		D-xylulose-5-P	D-ribose-5-P
TK sauvage	46,3	70 ± 10	146 ± 21
His30Ala	0,69	1010 ± 170	290 ± 100
His263Ala	0,23	23 ± 5	93 ± 10

**Tableau 9 : Paramètres cinétiques de la TK sauvage et des TK mutées en position 30 et 263**

➤ Rôle de l'Asp477 pour le contrôle de l'énantiosélectivité de la TK

L'étude de la spécificité vis-à-vis du substrat accepteur, a montré que la réaction catalysée par la TK est énantiosélective vis-à-vis des aldéhydes α-hydroxylés de configuration R. Dans le but de déterminer le résidu du site actif impliqué, une étude a été menée au laboratoire et en collaboration avec l'équipe de Schneider (Tableau 10).

Substrats accepteurs		$k_{cat}/K_m$ ( $M^{-1}.s^{-1}$ )	
		TK sauvage Asp477	TK Asp477Ala
D-érythrose-4-P		$1,7.10^6$	$4,5.10^3$
D-thréose-4-P		$0,7.10^2$	$0,5.10^2$
D-arabinose-5-P		$1,1.10^2$	$0,5.10^2$
2-désoxy-D-érythrose		$3.10^2$	$1,8.10^3$
2-désoxy-D-ribose-5-P		$1,2.10^2$	$1,1.10^2$

**Tableau 10 : Constantes cinétiques de la TK en présence de substrats non hydroxylés en  $\alpha$  du carbonyle**

D'après les données cristallographiques, l'Asp477 interagit par une liaison hydrogène avec le groupe hydroxyle en position  $\alpha$  de la fonction aldéhydrique du D-érythrose-4-phosphate. Le rôle majeur de l'Asp477 a été confirmé par des expériences de mutagenèse dirigée et par des études cinétiques en présence d'analogues du D-érythrose-4-phosphate que l'équipe du SEESIB a mené en collaboration avec celle du Pr.Schneider<sup>95</sup>. En effet, lorsque ce substrat est remplacé par des analogues non hydroxylés en  $\alpha$  du carbonyle (le 2-désoxy-D-ribose-5-phosphate et le 2-désoxy-D-érythrose-4-phosphate) ou par des analogues dont la configuration de l'hydroxyle porté par le C<sub>2</sub> est *S* (le D-arabinose-5-phosphate et le D-thréose-4-phosphate), l'efficacité et l'énantiosélectivité de la TK diminuent fortement (tableau 10). De plus, quand l'Asp477 est remplacé par une alanine, des résultats analogues sont obtenus.

La concordance de ces résultats a permis de confirmer que le résidu Asp477 est impliqué dans la reconnaissance du groupement hydroxyle en  $\alpha$  du carbonyle et qu'il contrôle l'énantiosélectivité de la réaction.

➤ Rôle des acides aminés impliqués dans la stabilisation du groupement phosphate<sup>94</sup>

Le site actif de la TK est relativement profond car des substrats phosphorylés comportant 3 à 7 carbones sont acceptés. La flexibilité est apportée par quatre résidus (Arg359, Ser386, His469 et Arg528) qui interagissent avec les substrats par des liaisons de

faible énergie telles que des liaisons hydrogènes et une liaison électrostatique. Les deux arginines stabilisent les groupements phosphates des substrats ayant une chaîne carbonée supérieure ou égale à 4 tandis que l'histidine et la sérine stabilisent les groupements phosphates des cétooses comportant 3 ou 4 carbones.

Des études cinétiques ont permis de préciser que le substrat accepteur, le D-ribose-5-phosphate, est plus fortement stabilisé par ces résidus que le substrat donneur, le D-xylulose-5-phosphate. Lorsque chacun des trois acides aminés impliqués (Arg359, Arg528 et His469) est remplacé par une alanine par mutagenèse dirigée, l'activité catalytique de la TK en présence de D-xylulose-5-phosphate et de D-ribose-5-phosphate est diminuée mais conservée (Tableau 11). En revanche, la perte de l'affinité des TK mutées est plus notable vis-à-vis du D-ribose-5-phosphate. Ce résultat montre que ces résidus interagissent principalement avec le D-ribose-5-phosphate, substrat accepteur de la TK.

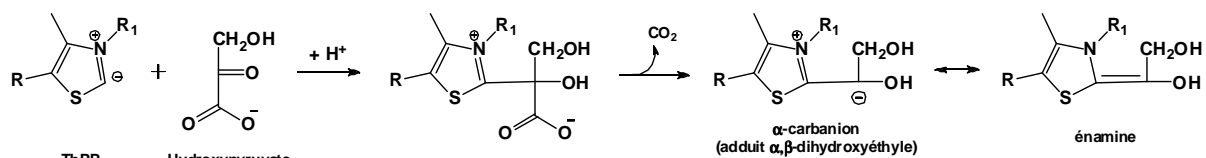
Enzyme	Activité en %	K <sub>m</sub> apparente (μM)	
		D-xylulose-5-P	D-ribose-5-P
TK sauvage	100	73 ± 7	146 ± 21
His469Ala	77	829 ± 97	5970 ± 628
Arg359Ala	31	163 ± 29	5650 ± 720
Arg528Ala	17	318 ± 36	7000 ± 950

**Tableau 11 : Paramètres cinétiques de la TK sauvage et des TK mutées**

En conclusion, ces résidus ne sont donc pas impliqués dans la catalyse enzymatique mais dans la stabilisation des substrats dans le site actif. Ce résultat est en accord avec les études cinétiques déjà réalisées concernant la spécificité de substrat de la TK. Elles ont montré que la TK est capable de catalyser la réaction en présence de substrats non-phosphorylés<sup>96</sup>.

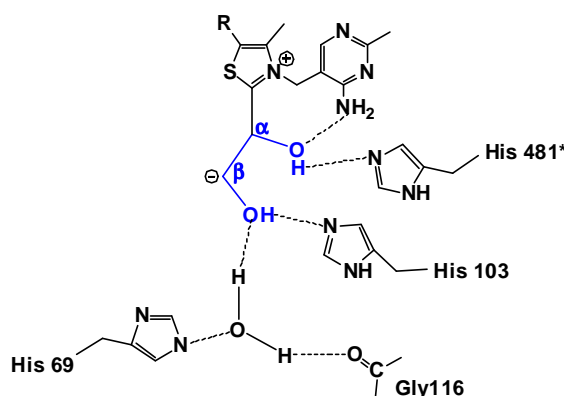
### **3.3.2. Co-cristallisation de la TK de *S. cerevisiae* avec l'acide hydroxypyruvique (HPA)**

Schneider et ses collaborateurs ont cristallisé la TK de *S. cerevisiae* en présence de HPA (substrat donneur non phosphorylé utilisé dans les synthèses *in vitro* car sa décarboxylation par la TK rend la réaction irréversible (Figure 44)).



**Figure 44 : Réaction entre HPA et ThDP**

Une structure cristalline a été obtenue avec l'adduit  $\alpha,\beta$ -dihydroxyéthyle formé avec le ThDP après décarboxylation par la TK, avec une résolution 1,86 Å<sup>86</sup>. Les données cristallographiques ont permis de mettre en évidence les interactions du site actif avec le complexe ThDP/ $\alpha,\beta$ -dihydroxyéthyle (Figure 45).



**Figure 45 : Interactions du site actif avec le complexe ThDP/ $\alpha,\beta$ -dihydroxyéthyle.**

L'hydroxyle du carbone  $\alpha$  (lié de façon covalente au carbone 2 du cycle thiazolium) est en interaction par liaisons hydrogènes avec l'amine du cycle pyrimidine du ThPP et l'His481 de l'autre sous-unité. L'hydroxyle du carbone  $\beta$  est en interaction par liaison hydrogène avec l'His103 et interagit également *via* une molécule d'eau avec les résidus Gly166 et His69.

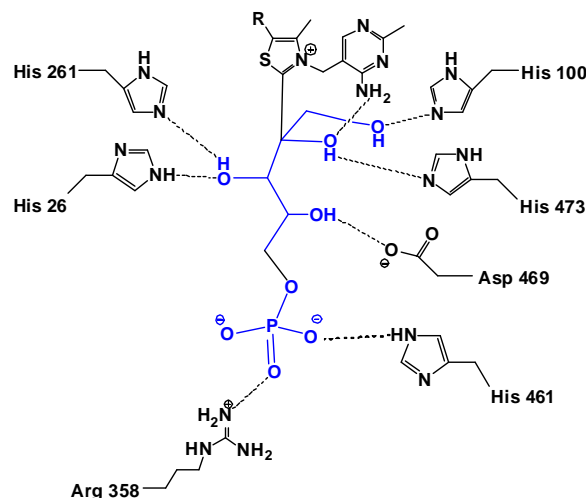
### **3.3.3. Co-cristallisation de la TK de *E. coli* avec le D-xylulose-5-P, le D-fructose-6P et le D-ribose-5P**

La TK de *E. coli* a récemment été cristallisée en présence de différents substrats<sup>87</sup> : les deux cétones donneurs naturels, le D-xylulose 5-P et le D-fructose-6P et un des aldoses accepteurs naturels, le D-ribose-5-P. Cette étude montre des interactions semblables à celles envisagées ou modélisées à partir de la TK de *S. cerevisiae*. La figure ci-dessous indique les interactions avec le D-xylulose -5-P, substrat donneur.

Les hydroxyles des carbones 1 et 2 interagissent respectivement avec les résidus His473 et His100 et l'amine du cycle pyrimidine du ThPP. Les résidus His261 et His26



interviennent dans le contrôle de la stéréospécificité par interaction avec l'hydroxyle du carbone 3 alors que le résidu Asp469 est impliqué dans le contrôle de l'énantiosélectivité



**Figure 46 : Mise en évidence des résidus du site actif de la TK de *E. coli* impliqués dans la fixation du substrat donneur (D-ribose -5-P lié au ThPP) et dans la catalyse**

Le groupement phosphate du carbone 5 présente des interactions avec les résidus His461 et Arg358. La seule différence notable avec le mode de fixation du D-Fructose-6-P, substrat donneur présentant un carbone de plus par rapport au D-Xylulose-5-P, est l'interaction de la Ser385 avec l'hydroxyle du carbone 5 du D-fructose-6-P (Figure 46).

### **3.3.4. Comparaison des résidus clés intervenant dans le site actif de la TK de *S. cerevisiae* avec ceux de *E. coli* et de l'homme**

Il apparaît que les résidus clés notamment les deux His30 et 263 chez la levure intervenant dans la catalyse jouent le même rôle chez *E. coli*<sup>90</sup> et chez l'homme<sup>97</sup>. De plus, nous avons vu précédemment que l'énantiosélectivité est contrôlée chez la TK de levure par l'Asp 477 et récemment chez *E.coli* il a été montré qu'un résidu Asp469 a la même fonction. Trois résidus viennent également stabiliser le groupement phosphate avec une forte analogie entre les TK de *E.coli* et de l'homme.

Rôle du résidu	<i>S. cerevisiae</i>	<i>E. coli</i>	Humaine
Catalyse	His30	His26	His37
	His263	His261	His258
Enantiosélectivité	Asp477	Asp469	-
Stabilisation du groupement phosphate du substrat	His469	His461	-
	Arg359	Arg358	Arg318
	Ser386	Ser385	Arg474

**Tableau 12 : Résidus intervenant dans le site actif de la TK de *S.cerevisiae*, de *E. coli* et de l'homme**

## 4. Mécanisme réactionnel de la TK

D'après les expériences de mutagenèse dirigée et les données cristallographiques, un mécanisme catalytique pour la TK de levure a été proposé<sup>98</sup> et peut être adapté aux TK de *E. coli* et de l'homme, les sites actifs étant similaires.

La première étape commune à toutes les enzymes qui utilisent le ThDP consiste en la déprotonation du C<sub>2</sub> du cycle thiazole qui conduit à la forme activée du ThDP. Le résidu Glu418 (Glu336 pour la TK humaine<sup>97</sup>) protone l'atome d'azote N<sub>1</sub>' du cycle pyrimidine (**a**) conduisant à la formation du groupe iminium chargé positivement (**b**). Le C<sub>2</sub> du cycle thiazole est alors déprotoné (**c**) par le résidu His481 (His110 pour la TK humaine<sup>97</sup> et His473 pour la TK d'*E. coli*<sup>87</sup>) (Figure 47). Bien que la conformation en V du ThDP ne soit pas favorisée thermodynamiquement, elle permet la stabilisation du carbanion du C<sub>2</sub> du cycle thiazolium par le groupement iminium du cycle pyrimidine.

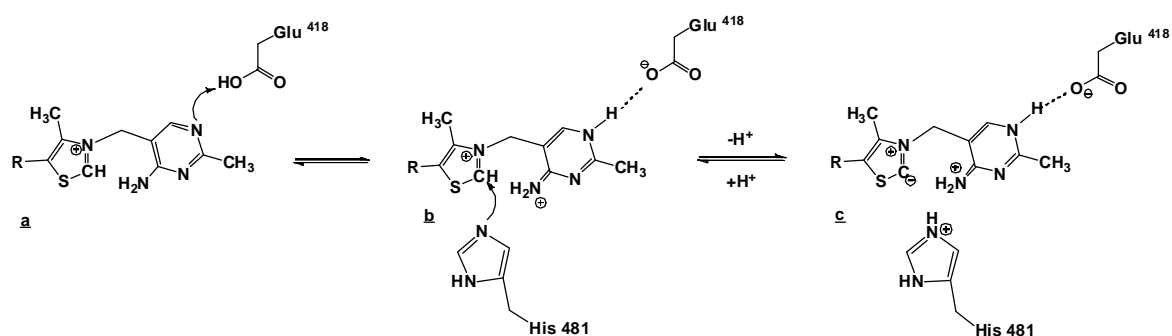


Figure 47 : Mécanisme d'activation du ThPP

Puis, le carbanion **c** formé attaque le groupe carbonyle du D-xylulose-5-phosphate (**d**) qui peut être protoné soit par le groupe iminium chargé positivement du cycle pyrimidine ou bien par le résidu His481<sup>98</sup> (cette dernière hypothèse est retenue dans le mécanisme décrit dans la Figure 48).

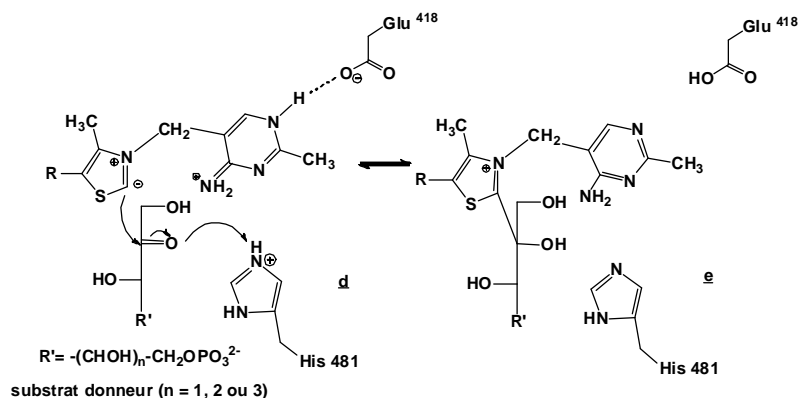


Figure 48 : Mécanisme de formation de la liaison covalente entre le substrat donneur et le ThPP

Ensuite, l'His263 (His261 pour la TK de *E. coli* et His258 pour la TK humaine) est parfaitement positionnée pour arracher le proton du groupement hydroxyle du C<sub>3</sub> du substrat donneur lié au ThDP (**f**). Le D-glycéraldéhyde-3-phosphate est alors libéré. La charge négative de l'intermédiaire  $\alpha,\beta$ -dihydroxyéthyl-pyrophosphate de thiamine (**g**) est stabilisée par effet mésomère (**h**) (Figure 49).

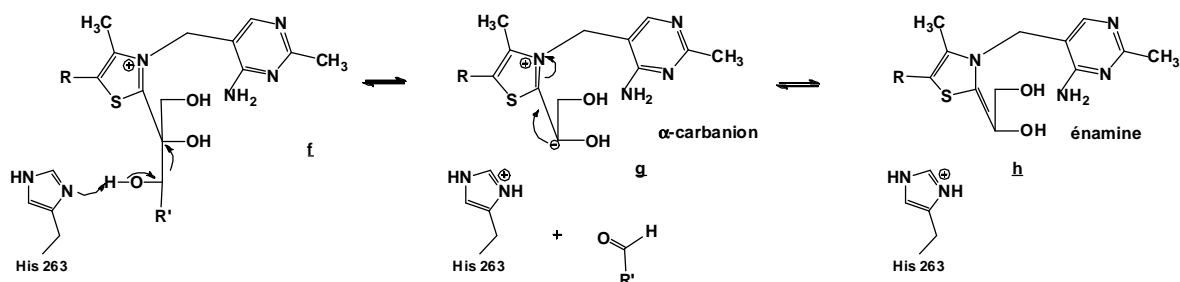


Figure 49 : Mécanisme de formation de l'intermédiaire  $\alpha,\beta$ -dihydroxyéthyl-ThPP

Le carbanion **g** attaque alors la face *ré* de la fonction aldéhyde du substrat accepteur, l'oxygène étant protoné par l'His263. Le nouveau carbone asymétrique formé est de configuration *S*. La rupture de la liaison qui lie le C<sub>2</sub> du cycle thiazolium (**i**) via la déprotonation du groupement hydroxyle conduit à la libération du produit final de configuration (3*S*,4*R*) et du ThDP (**j**) (Figure 50).

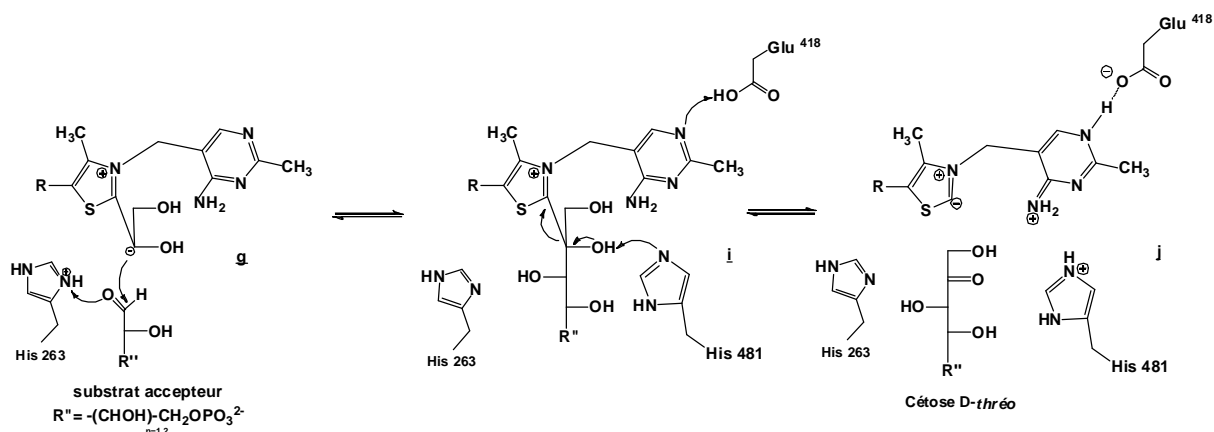


Figure 50 : Mécanisme d'attaque du substrat accepteur et libération du produit formé

## 5. Etude et modification de la spécificité de substrat de la TK

Depuis quelques années, les TK issues de *S. cerevisiae* et *E. coli*<sup>99</sup> sont surexprimées à l'aide de vecteurs d'expression et sont maintenant les seules utilisées en biocatalyse. La forte homologie des sites actifs de ces deux sources de TK explique qu'aucune différence notable n'est été relevée lors des études de spécificité de substrat.

## 5.1. Etude de la spécificité de la TK

La réaction catalysée par la TK est réversible en présence des substrats naturels. La position de l'équilibre en présence du D-xylulose-5-phosphate comme donneur et du D-ribose-5-P comme accepteur est de 1,2 en faveur des produits formés (glycéraldéhyde-3-P et D-sédoheptulose-7-P)<sup>100</sup>.

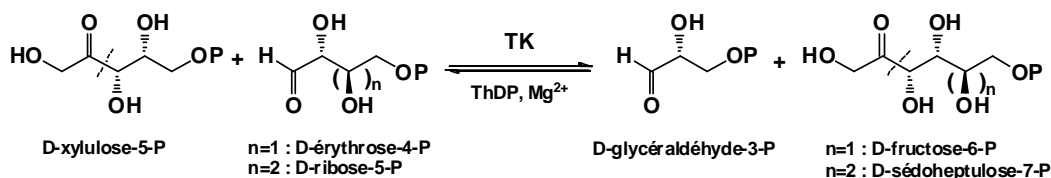


Figure 51 : Réaction catalysée *in vivo* par la TK

La spécificité de la TK vis-à-vis de substrats donneurs et accepteurs non naturels a été étudiée dans le but d'utiliser cette réaction pour la synthèse de cétooses et analogues phosphorylés ou non.

### 5.1.1. Vis-à-vis du substrat donneur

Dans le but d'utiliser la réaction catalysée par la TK à des fins synthétiques de nombreux substrats donneurs non phosphorylés ont été envisagés (Figure 52)

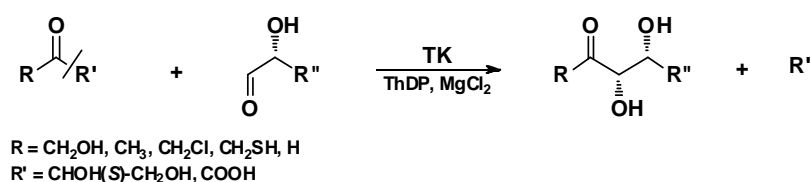
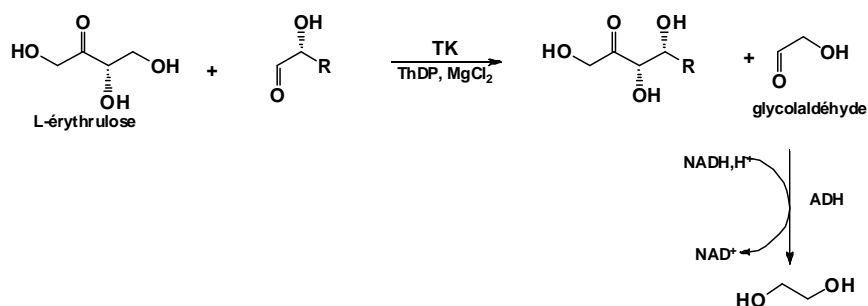


Figure 52 : Réaction catalysée par la TK en présence de substrats donneurs non naturels

Une étude réalisée au laboratoire SEESIB a montré que l'hydroxypyruvate<sup>104</sup> (HPA : R = CH<sub>2</sub>OH et R' = COOH) est un substrat donneur de la TK. La décarboxylation de ce substrat par la TK rend la réaction irréversible ce qui représente un avantage certain dans le cadre de l'utilisation de cette enzyme en synthèse. D'autres substrats donneurs ont été envisagés et notamment le L-érythrulose<sup>112</sup> (R = CH<sub>2</sub>OH et R' = CHOH(S)-CH<sub>2</sub>OH). En présence de ce substrat, la réaction devient irréversible quand le glycolaldéhyde libéré est réduit par l'alcool déshydrogénase (ADH) en présence de NADH, H<sup>+</sup> (Figure 53). Cette réaction est utilisée pour déterminer l'activité de la TK (le D-xylulose-5-P, substrat donneur naturel utilisé auparavant, n'étant plus commercial).



**Figure 53 : Réaction catalysée par la TK en présence de L-érythrulose**

D'après les études cinétiques, la TK de levure présente une plus faible affinité vis-à-vis de l'HPA ( $K_m = 33 \text{ mM}^{84}$ ) que vis-à-vis du L-érythrulose ( $K_m = 5 \text{ mM}^{100}$ ). Cependant, le procédé mettant en jeu l'HPA est plus largement utilisé à des fins synthétiques car la réaction est irréversible.

Des analogues de l'HPA ont été proposés dans le but d'accéder à des analogues de cétooses substitués en position 1 : pyruvate ( $\text{R} = \text{CH}_3$  et  $\text{R}' = \text{COOH}$ ), chloropyruvate, ( $\text{R} = \text{CH}_2\text{Cl}$  et  $\text{R}' = \text{COOH}$ ) et mercaptopyruvate ( $\text{R} = \text{CH}_2\text{SH}$  et  $\text{R}' = \text{COOH}$ ). Aucun de ces composés ne s'est révélé être un substrat de la TK (Tableau 13).

Cependant, en présence de glyoxylate comme substrat donneur ( $\text{R} = \text{H}$  et  $\text{R}' = \text{COOH}$ ), il a été décelé une faible activité. La TK transfère alors un groupement formyle sur un aldéhyde accepteur. Cette propriété a été confirmée puisqu'en présence de L-arabinose et de glyoxylate, du L-glucose a été obtenu. Cependant, la réaction est extrêmement lente et le rendement faible (inférieur à 10 %) <sup>101</sup>.

Donneur	Accepteur	$K_m$ en mM	$V_{Max}$ en $\text{U.mg}^{-1}$
D-xylulose-5-P (substrat naturel)	D-R-5-P	0,2	20
R = $\text{CH}_2\text{OH}$ R' = $\text{CHOH-CH}_2\text{OH}$ (L-érythrulose)	D-R-5-P	ND	2,6
	D-G-3-P	4,9	ND
R = $\text{CH}_2\text{OH}$ R' = $\text{COOH}$	D-G-3-P	33	ND
	D-E-4-P	7	ND
R = $\text{CH}_3$ R' = $\text{COOH}$	D-G-3-P	-	-
R = $\text{CH}_2\text{Cl}$ R' = $\text{COOH}$	D-G-3-P	-	-
R = $\text{CH}_2\text{SH}$ R' = $\text{COOH}$	D-G-3-P	-	-
R = H R' = $\text{COOH}$	D-glycéraldéhyde	ND	0,65
	Glycolaldéhyde	ND	0,54

**Tableau 13 : Paramètres cinétiques de la TK vis-à-vis des différents substrats donneurs**

(ND : non déterminée)

### 5.1.2. Etude de la spécificité de la TK vis-à-vis du substrat accepteur

Quelques exemples d'aldéhydes accepteurs sont indiqués dans le tableau suivant (Tableau 14)<sup>102</sup>. Il est à noter que le glycolaldéhyde est le meilleur substrat accepteur de la TK devant les substrats accepteurs phosphorylés et à ce titre, il est pris comme référence pour le calcul des vitesses relatives.

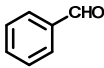
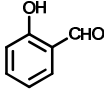
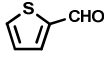
Substrats accepteurs		Vitesse relative en %
Substrat de référence	CH <sub>2</sub> OH-CHO	100
Accepteurs « naturels » non phosphorylés	D-érythrose	84
	D-ribose	30
Composés polyhydroxylés	CH <sub>2</sub> OH-CHOH-CHO ( <i>R</i> ) <b>a</b>	77
	CH <sub>2</sub> OH-CHOH-CHO( <i>S</i> ) <b>b</b>	<1
Composés non hydroxylés en α	CH <sub>3</sub> -CHOH-CH <sub>2</sub> -CHO ( <i>R, S</i> ) <b>c</b>	29
	CH <sub>2</sub> OH-CHOH-CH <sub>2</sub> -CHO ( <i>R, S</i> ) <b>d</b>	43
	CH <sub>2</sub> OH-CHOH-CH <sub>2</sub> -CHO ( <i>R</i> ) <b>e</b>	45
Composés hydroxylés en α et non hydroxylés en β	CH <sub>3</sub> SCH <sub>2</sub> -CHOH-CHO ( <i>R, S</i> ) <b>f</b>	33
	CH <sub>3</sub> -CHOH-CHO ( <i>R, S</i> ) <b>g</b>	44
	CH <sub>2</sub> F-CHOH-CHO ( <i>R, S</i> ) <b>h</b>	47
	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CHOH-CHO ( <i>R, S</i> ) <b>i</b>	33
	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CHOH-CHO ( <i>R, S</i> ) <b>j</b>	22
	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> C-CHOH-CHO ( <i>R, S</i> ) <b>k</b>	11
	CH <sub>2</sub> OH-CH <sub>2</sub> -CHOH-CHO ( <i>R, S</i> ) <b>l</b>	< 10
Composés non hydroxylés	CH <sub>3</sub> - CHO <b>m</b>	25
	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> - CHO <b>n</b>	11
Composés éthyléniques	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -C=CH-CHO <b>o</b>	11
	CH <sub>2</sub> =CH-CHOH-CHO ( <i>R, S</i> ) <b>p</b>	56
	CH <sub>2</sub> =CH-CH <sub>2</sub> -CHOH-CHO ( <i>R, S</i> ) <b>q</b>	28
	CH <sub>2</sub> =CH-(CHOH) <sub>2</sub> -CHO ( <i>2R, 3S</i> ) <b>r</b>	36
	CH <sub>2</sub> =CH-(CHOH) <sub>2</sub> -CHO ( <i>2R, 3R</i> ) <b>s</b>	32
Composés aromatiques	 <b>t</b>	< 10
	 <b>u</b>	28
Composé hétérocyclique	 <b>v</b>	32

Tableau 14 : Quelques exemples de substrats accepteurs

La TK montre une très nette préférence pour les aldéhydes  $\alpha$ -hydroxylés de configuration *R* (**a** par rapport à **b**) conduisant ainsi à des cétooses de configuration *D-thréo*. Cette propriété est exploitée pour dédoubler des mélanges racémiques d' $\alpha$ -hydroxyaldéhydes.

L'absence de groupement hydroxyle en position  $\alpha$  de la fonction aldéhyde diminue l'activité (comparaison de **c**, **d**, **e** avec le *D*-érythrose). En revanche, l'absence de groupement hydroxyle en  $\beta$  semble n'avoir que peu d'influence sur l'activité de la TK (**f**, **g**, **h**, **i**), il est en est de même pour la configuration du carbone en  $\beta$ . Cependant la présence d'un groupement encombrant dans cette position diminue l'activité (**j**, **k**).

En présence d'aldéhydes aliphatiques, l'activité de la TK diminue avec l'augmentation du nombre de carbone des substrats (**m**, **n**). Le présence de double liaisons ne semble pas influencer l'activité (**o**, **p**, **q**, **r**, **s**) sauf pour les insaturations en position  $\alpha,\beta$  de la fonction aldéhyde (**o**).

Les aldéhydes cycliques conduisent à une faible activité de la TK (**t**), mais la présence d'un groupement hydroxyle en ortho (**u**) ou d'un hétéroatome au sein du cycle (**v**) améliore l'activité.

Compte tenu de ces résultats, le potentiel synthétique de la TK a été largement exploité. Nous allons indiquer des exemples de synthèse de cétooses *D-thréo* présentant des activités biologiques.

## **5.2. Exemples d'utilisation de la TK en synthèse organique**

### **5.2.1. Synthèse du D-[1,2- $^{13}\text{C}_2$ ] xylulose<sup>103</sup>**

Le marquage isotopique des sucres est souvent utilisé pour étudier le devenir des molécules biologiques dans les voies métaboliques. La réaction catalysée par la TK peut s'étendre à la synthèse de cétooses marqués à condition de disposer de substrats radiomarqués, comme l'hydroxypyruvate. La synthèse de ce dernier a été réalisée par oxydation de la D,L-[1,2- $^{13}\text{C}_2$ ]-sérine commerciale en présence de la D-amino-oxydase (D-AAO). L'hydroxypyruvate formé est ainsi piégé au fur et à mesure de sa formation en présence de glycéraldéhyde et de la TK de feuilles d'épinard.

Cette stratégie a été développée au laboratoire, en une seule étape avec la TK extraite de feuilles d'épinard, à l'échelle de 2 mmoles à partir de la D,L-[1,2- $^{13}\text{C}_2$ ]-sérine enrichie à 7 %. Cette synthèse est une des premières applications décrites de la TK. Le D-[1,2- $^{13}\text{C}_2$ ] xylulose a été obtenu avec un rendement de 37 % (Figure 54). Cette méthode est originale car

elle peut être appliquée à la synthèse de nombreux cétones ou analogues marqués à partir d'un précurseur unique, la D,L-[1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]-sérine.

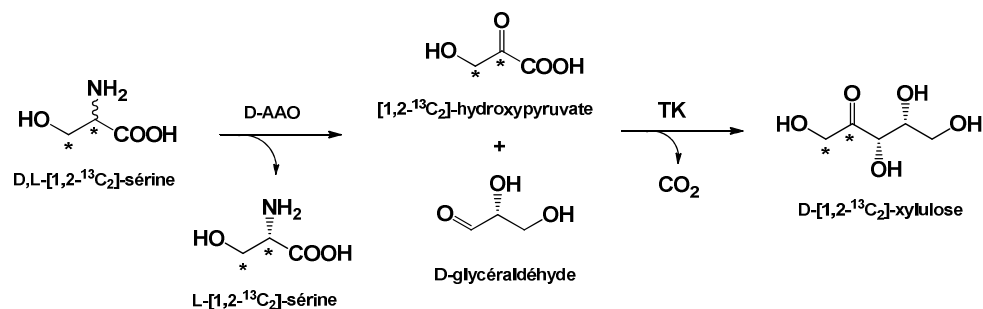


Figure 54 : Voie de synthèse du D-[1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>] xylulose

### 5.2.2. Synthèse du 6-désoxy-L-sorbose, précurseur du furanéo<sup>104</sup>

Le 6-désoxy-L-sorbose est un précurseur d'un arôme conférant un goût de caramel aux produits issus de l'industrie agroalimentaire, le 4-hydroxy-2,5-diméthyl-3(2*H*)-furanone (HDMF). Au laboratoire SEESIB et en collaboration avec le groupe Sanofi, une stratégie a été mise en œuvre pour accéder au 6-désoxy-L-sorbose « naturel » par condensation de l'hydroxypyruvate et du 4-désoxy-L-thréose en présence de la TK de feuilles d'épinard. L'hydroxypyruvate est synthétisé à partir de la L-sérine par voie enzymatique impliquant la sérine aminotransférase (SGAT). Le 4-désoxy-L-thréose est préparé en deux étapes à partir de l'hydroxypyruvate et de l'acétaldéhyde (Figure 55).

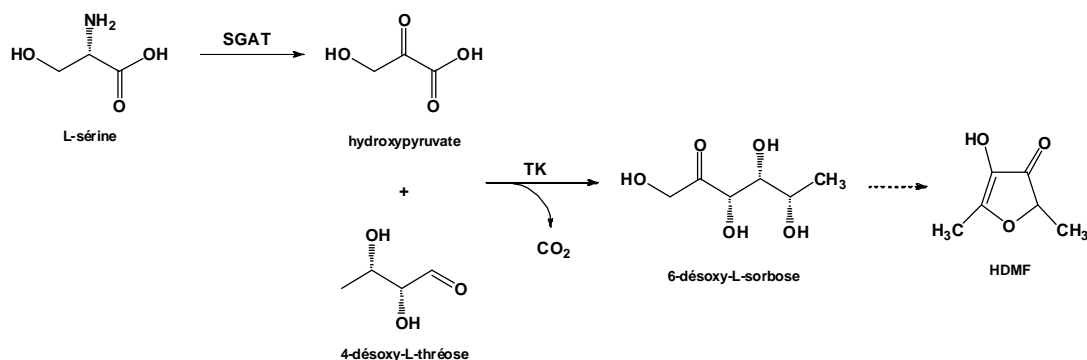


Figure 55 : Synthèse du 6-désoxy-L-sorbose

### 5.2.3. Synthèse de la (+)-*exo*-brévicomine<sup>105</sup>

La (+)-*exo*-brévicomine est une des phéromones sécrétées par le scarabée. Ce composé est préparé en sept étapes à partir du 2-hydroxybutanal qui est utilisé comme substrat accepteur de la TK de *S. cerevisiae* en présence d'hydroxypyruvate. Le cétose obtenu, précurseur de la brévicomine, est synthétisé avec un rendement de 45 % (Figure 56).



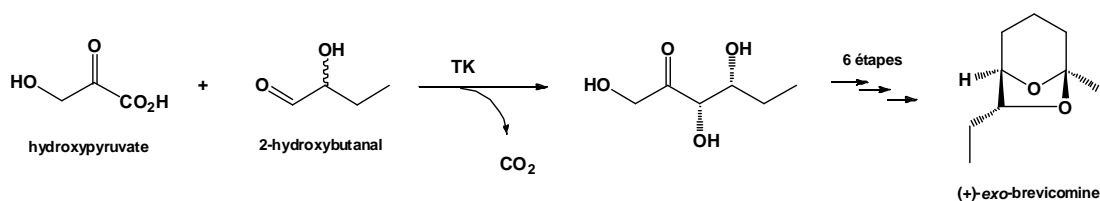


Figure 56 : Synthèse chimioenzymatique de la (+)-*exo*-brévicomine

#### 5.2.4. Synthèse du 1,4-didésoxy-1,4-imino-D-arabinitol<sup>106</sup>

Le 1,4-didésoxy-1,4-imino-D-arabinitol est un inhibiteur potentiel des glycosidases ( $\alpha$ -glucosidase de classe II du réticulum endoplasmique,  $\alpha$ -mannosidase de classes I et II du Golgi, *etc*). Il est possible d'obtenir un précurseur de cet azasucré en deux étapes et avec un bon rendement à partir du (*R,S*)-3-azido-2-hydroxypropanal et de l'hydroxypyruvate en présence de TK de *E. coli* (Figure 57).

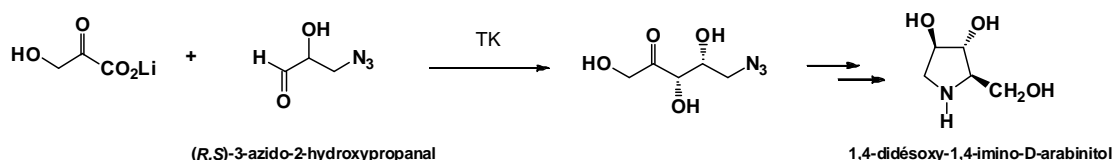


Figure 57 : Synthèse du 1,4-didésoxy-1,4-imino-D-arabinitol

#### 5.2.5. Synthèse d'aminoalcools<sup>107</sup>

Le 2-amino-1,2,3-butanetriol est un composé utilisé comme précurseur de nombreuses molécules comme des statines, des inhibiteurs de protéases (comme le Nelfinavir, utilisé dans le traitement du SIDA) ou des agents détoxifiants.

Une synthèse « one-pot » à partir d'hydroxypyruvate et de glycolaldéhyde en présence de TK de *E. coli* et d'une  $\beta$ -alanine/pyruvate transaminase de *E. coli* a permis d'obtenir ce composé sous forme énantiomériquement pure avec un rendement de 21 % (Figure 58).

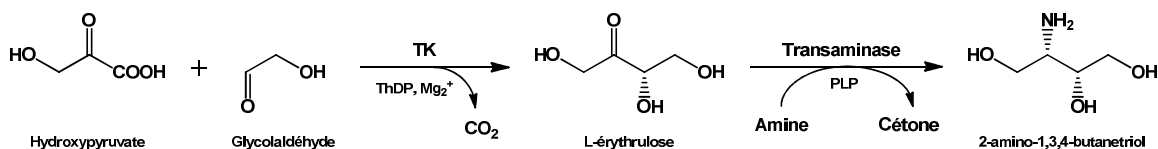


Figure 58 : Synthèse "one-pot" du 2-amino-1,3,4-butanetriol basée sur l'utilisation de la TK et d'une transaminase.

Cette synthèse a été réalisée en présence d'extrait cellulaire d'une souche de *E. coli* surexprimant les deux enzymes impliquées. La réaction de transamination étant l'étape limitante de la synthèse, la modification de la transaminase par mutagenèse est proposée par les auteurs pour améliorer sa spécificité vis-à-vis du L-érythrulose et ainsi augmenter le rendement global de la synthèse.

### 5.2.6. Synthèse de cétooses phosphorylés

#### ➤ Synthèse du D-xylulose-5-phosphate

La synthèse du D-xylulose-5-phosphate représente un challenge parce qu'il n'est plus commercialisé. Ce composé est utilisé comme substrat pour le dosage de nombreuses enzymes. C'est également un agoniste d'une protéine phosphatase humaine (PP2A) impliquée dans des systèmes de régulation cellulaire.

Fessner *et al.* ont proposé une synthèse enzymatique « one-pot » du D-xylulose-5-phosphate à l'échelle du gramme en présence de la fructose-1,6-bisphosphate-aldolase de muscle de lapin (RAMA) et de la TK de *E. coli*<sup>108</sup> (Figure 59).

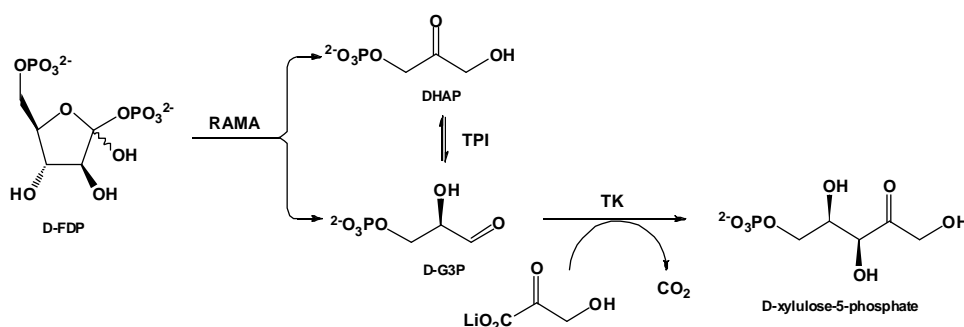


Figure 59 : Synthèse du D-xylulose-5-phosphate par voie enzymatique

La RAMA catalyse la rétro-aldolisation du D-fructose-1,6-bisphosphate (D-FDP). Il en résulte un mélange de dihydroxyacétone-phosphate (DHAP) et de D-glycéraldéhyde-3-phosphate (D-G3P). La triose phosphate isomérase (TPI) convertit le DHAP en D-G3P qui est ensuite impliqué dans la réaction catalysée par la TK d'*E. coli* en présence de HPA. Le D-xylulose-5-phosphate est obtenu avec un rendement global de 82 %.

#### ➤ Synthèse du 4-désoxy-D-fructose-6-phosphate<sup>109</sup>

Le 4-désoxy-D-fructose-6-phosphate est un composé qui est largement utilisé comme sonde pour étudier le métabolisme des sucres. La stratégie mise en place au laboratoire SEESIB pour accéder à ce composé consiste à utiliser une époxyde hydrolase qui permet d'obtenir le substrat accepteur de la TK (Figure 60).

Le (R,S)-1,1-diéthoxy-3,4-époxybutane **a** est dédoublé par une époxyde hydrolase d'*Aspergillus niger* et conduit à l'époxyde (S)-**b** (ee > 98 %). Ce dernier est ensuite converti en deux étapes en l'aldéhyde (2S)-**c** qui réagit alors avec le L-érythrulose **d** en présence de la TK de *S. cerevisiae* pour donner le composé attendu avec un rendement de 52 %. Afin de déplacer l'équilibre de la réaction enzymatique, le glycolaldéhyde libéré **e** est réduit par

l'alcool déshydrogénase en présence de NADH, H<sup>+</sup>, régénéré par le système formiate/formiate déshydrogénase (FDH) de levure.

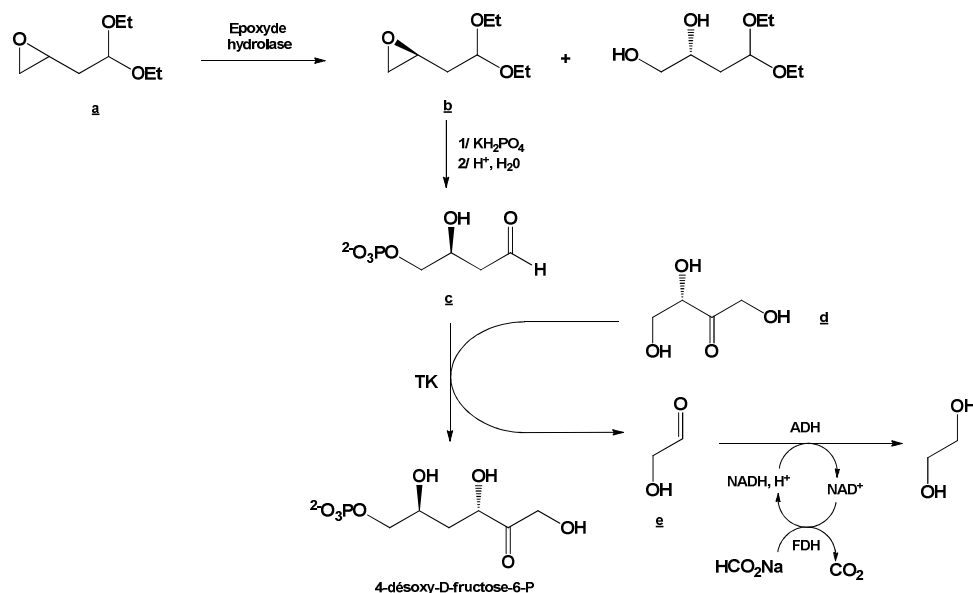


Figure 60 : Synthèse du 4-désoxy-D-fructose-6-phosphate par voie chimioenzymatique

### ➤ Synthèse du D-sédoheptulose -7-phosphate<sup>110</sup>

Le sédoheptulose-7-phosphate est un composé important utilisé pour l'étude du métabolisme et pour la synthèse de différents composés à activité biologique, par exemple l'acarbose, un inhibiteur d' $\alpha$ -glycosidases ou la validamycine et la pyralomycine, des composés antibiotiques.

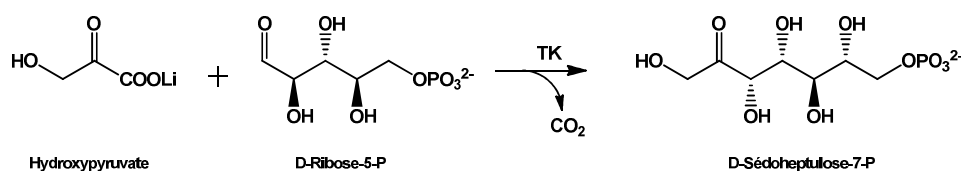


Figure 61 : Synthèse du D-sédoheptulose-7-phosphate

Une stratégie développée au laboratoire, basée sur l'utilisation d'hydroxypyruvate et de D-ribose-5-phosphate en présence de TK de levure, a permis d'obtenir ce composé à l'échelle de plusieurs grammes avec un rendement de 81 %.

## 5.3. Modification de la spécificité de substrat de la TK

Dans l'optique de modifier la spécificité de substrat de la TK par mutagenèse un test est nécessaire pour déterminer l'activité des TK. Nous allons dans un premier temps faire un bilan des tests décrits dans la littérature en indiquant leurs avantages et leurs inconvénients pour cribler des banques de TK mutées.

### 5.3.1. Tests permettant de déterminer l'activité de la TK

#### 5.3.1.1. Tests en présence de NADH

##### ➤ Test en présence du L-érythrulose

Ce test mis au point par l'équipe du laboratoire<sup>111</sup> a été développé en présence du L-érythrulose (Figure 62) comme substrat donneur à la place du D-xylulose-5-phosphate qui est le substrat naturel. Ce composé n'est plus commercialisé par Sigma et de plus sa synthèse est délicate que ce soit par voie chimique ou enzymatique. En présence de L-érythrulose, la réaction devient irréversible lorsque le glycolaldéhyde libéré est réduit par l'alcool déshydrogénase de levure (EC 1.1.1.1) en présence de NADH.

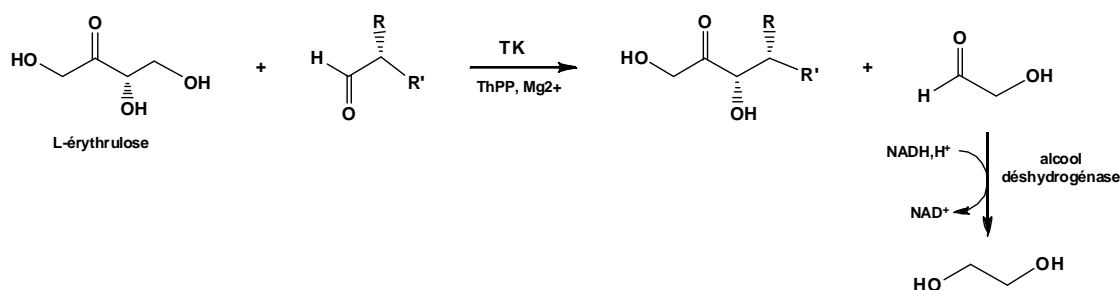


Figure 62 : Test basé sur l'utilisation du L-érythrulose

##### ➤ Test avec l'érythrose-4-P déshydrogénase

Ce test a également été développé pour pallier à l'indisponibilité du xylulose-5-P. En présence de D-fructose-6-phosphate et de D-glycéraldéhyde-3-phosphate, la TK catalyse la formation de D-xylulose-5-phosphate et de D-érythrose-4-phosphate. La réaction est rendue irréversible par la conversion du D-érythrose-4-phosphate en D-érythronate-4-phosphate par une érythrose-4-phosphate déshydrogénase en présence de NADH<sup>112</sup>.

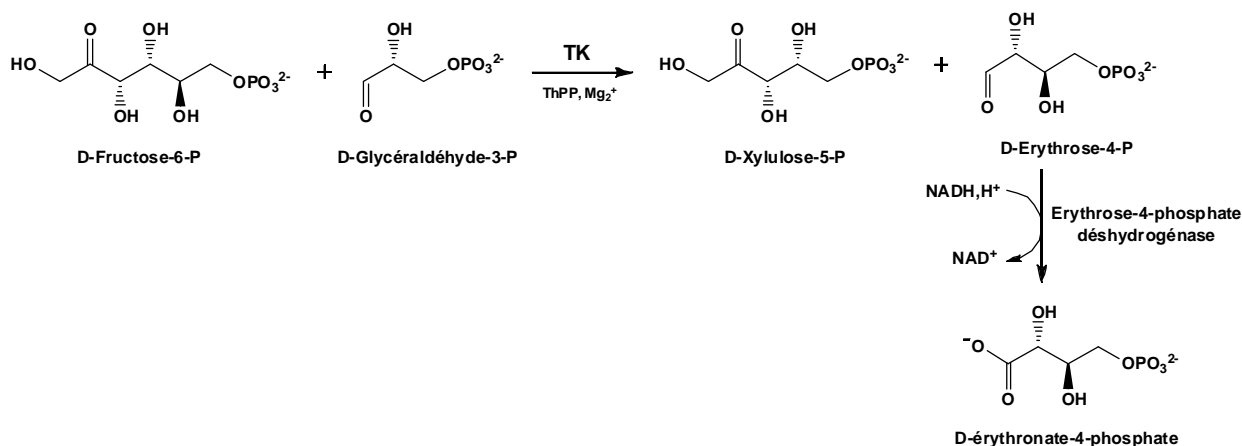


Figure 63 : Test basé sur l'utilisation de l'érythrose-4-P déshydrogénase

### ➤ Test avec la xylulose-5-phosphate kinase

Ce test reprend le principe du test classique du dosage d'activité de la TK reposant sur l'utilisation des deux substrats naturels : le D-xylulose-5-phosphate et le D-ribose-5-phosphate. L'originalité de cette approche repose sur l'utilisation d'une xylokinase recombinante de *S. cerevisiae*, clonée et exprimée dans *E. coli* qui va générer le xylulose-5-phosphate à partir de xylulose en présence d'ATP. Le xylulose-5-phosphate peut être produit *in situ* ou bien préparé avant utilisation<sup>113</sup>.

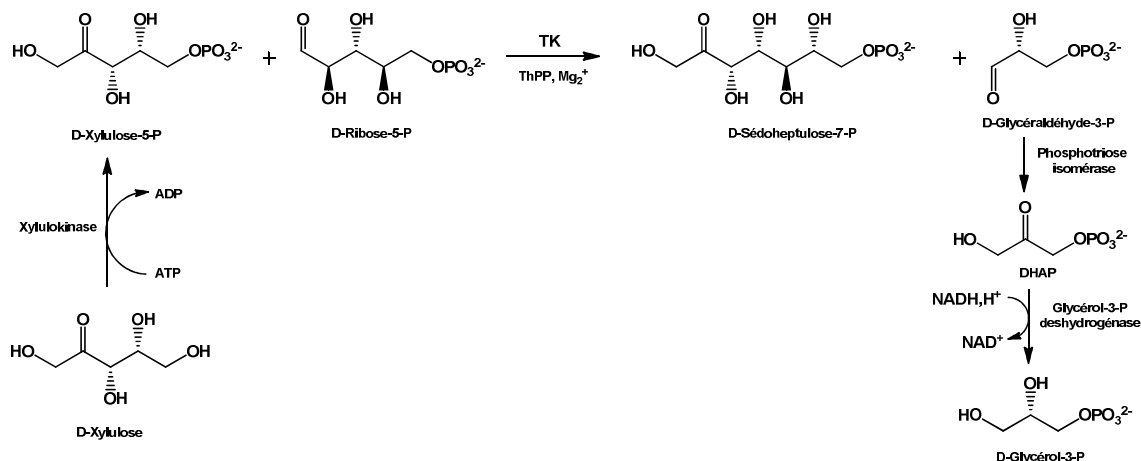


Figure 64 : Test basé sur l'utilisation d'une xylokinase.

Le D-glycéraldéhyde-3-phosphate formé en présence de TK est converti par la phosphotriose isomérase en dihydroxyacétone phosphate (DHAP). La DHAP est à son tour convertie en glycérol-3-phosphate par la glycérol-3-phosphate déshydrogénase en présence de NADH.

Ces trois tests sont basés sur l'utilisation d'oxydoréductases NADH-dépendantes ayant pour substrat l'aldéhyde  $\alpha$ -hydroxylé formé. Ces tests peuvent donc être théoriquement utilisés en présence de divers substrats donneurs et accepteurs dans le but de déterminer l'activité TK. Cependant, ces tests sont difficiles à utiliser pour le criblage de banques de TK (sous forme d'extrait brut) pour deux raisons essentielles : le coût du NADH et la présence d'un bruit de fond dû aux déshydrogénases présentes dans l'extrait cellulaire qui masque l'activité de la déshydrogénase couplée à la TK.

#### 5.3.1.2. Tests colorimétriques.

Un test colorimétrique basé sur la formation de formazan (composé rouge) à partir d'un sel de tétrazolum (incolore) a été développé pour déterminer l'activité TK en présence de l'hydroxypyruvate et de différents aldéhydes non  $\alpha$ -hydroxylés. Cette méthode repose sur l'utilisation d'un excès de tétrazolum et de soude en fin de réaction afin d'évaluer la quantité

de cétose formé. Cette méthode est rapide, peu coûteuse et relativement sensible mais l'utilisation de ce test est limitée aux substrats accepteurs non hydroxylés en  $\alpha^{114}$ .

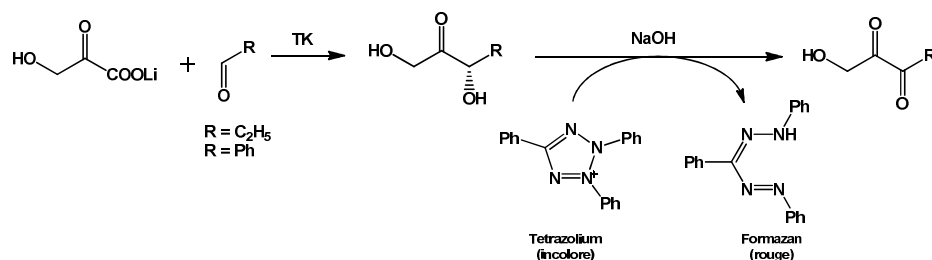


Figure 65 : Test colorimétrique pour l'activité TK basé sur la formation de formazan

### 5.3.1.3. Tests impliquant des substrats modifiés

Ces tests développés au laboratoire utilisent des sondes comportant un motif reconnu par l'enzyme (cétose *D-thréo*) sur lequel est greffé un groupement partant qui sera libéré en présence de sérum albumine bovine (BSA) selon le procédé décrit par Reymond et *al*.

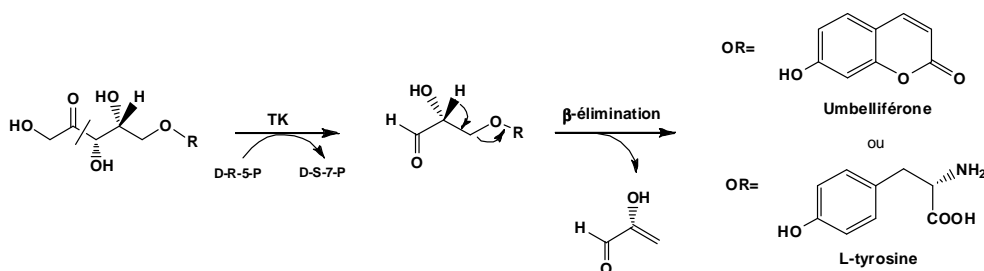


Figure 66 : Tests basés sur l'utilisation de substrats fluorogéniques ou précurseurs de L-tyrosine

Deux groupements partants ont été envisagés : l'umbelliférone (hautement fluorescente sous forme libre) et la L-tyrosine. Le test fluorogénique<sup>3,115</sup> est sensible (la fluorimétrie est  $10^3$  fois plus sensible que la spectrophotométrie) et spécifique. Cependant, ces composés du fait de l'encombrement stérique du groupement partant ont une faible activité vis-à-vis de la TK sauvage ce qui est un handicap lorsque l'on cherche à mettre en évidence des TK mutées qui auront une faible activité lors des premiers cycles de mutagenèse.

Le test impliquant le composé sur lequel est greffée la L-tyrosine<sup>4</sup> a été développé dans le but de concevoir un test de sélection *in vivo* en présence de cellules auxotrophes exprimant les TK mutées. Cependant, *in vitro*, ce type de composé n'est pas un meilleur substrat pour la TK par rapport à l'analogue comportant l'umbelliférone.

En conclusion, d'après l'analyse de la bibliographie seul le test basé sur la formation du formazan a permis de cribler des banques de TK mutées mais il n'est utilisable qu'en présence de substrats non  $\alpha$ -hydroxylés. De plus il nécessite plusieurs traitements des extraits enzymatiques pour éliminer les activités parasites et il est moins sensible que les tests fluorimétriques. Il n'existe aucun test de sélection pour cette enzyme.

### 5.3.2. Modification de la TK de *E. coli* par mutagenèse

Dalby et ses collaborateurs ont très récemment publié plusieurs études consacrées à la modification de la spécificité de substrat de la TK de *E. coli* par mutagenèse. Des TK mutées présentant une meilleure activité vis-à-vis des substrats accepteurs non phosphorylés et aliphatiques non  $\alpha$ -hydroxylés ont ainsi été mises en évidence. De plus des TK mutées conduisant à une inversion de la stéréosélectivité au niveau du carbone 3 du cétose formé ont été obtenues par cette même équipe.

#### 5.3.2.1. Amélioration de la spécificité vis-à-vis de substrats aldéhydiques accepteurs non phosphorylés.

L'équipe de Dalby a travaillé sur l'amélioration de l'activité de la TK de *E. coli* vis-à-vis des substrats non phosphorylés<sup>116</sup>. Le substrat accepteur choisi est le glycolaldéhyde. La mutagenèse par saturation de site ( « Quickchange™ ») a été utilisée en présence d'amorces présentant une dégénérescence de type NNN au niveau de deux séquences choisies selon deux approches.

D'une part une approche structurale a permis de cibler 10 résidus situés d'après la structure cristallographique à 4 Å du D-érythrose-4-phosphate, substrat naturel (His26, His100, Ile189, His261, Glu262, Arg358, Ser385, His461, Asp469, Arg520).

D'autre part, une approche phylogénétique basée sur l'alignement de 52 séquences de TK de différentes sources a permis de cibler 10 résidus non conservés et situés à 10 Å du ThDP.

Le test de criblage des TK repose sur la conversion du HPA et du glycolaldéhyde en L-érythrulose (Figure 67). La quantification du HPA résiduel et du L-érythrulose formé a été effectuée par HPLC.

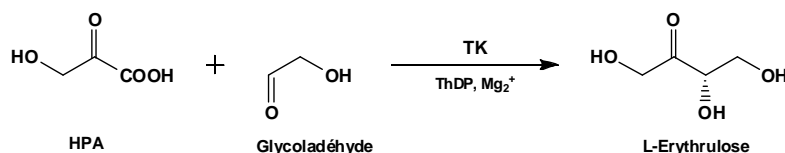


Figure 67 : Test basé sur la formation du L-érythrulose

A l'issu de cette étape de criblage, plusieurs enzymes mutées présentant une meilleure activité que l'enzyme sauvage vis-à-vis du glycolaldéhyde ont été identifiées (Tableau 15).

Stratégie	Enzyme	Activité relative*
-	Enzyme sauvage	1
Phylogénétique	Ala29Asp	2,7
	Ala29Glu	3,0
Structurale	His281Ser	4,8
	Arg520Stop	3,6
	Arg520Val	3,6

(\* : activité spécifique vis-à-vis de la formation du L-érythrulose)

**Tableau 15 : TK mutées présentant les meilleures activités vis-à-vis de la formation du L-érythrulose**

Les TK Ala29Asp et Ala29Glu présentent une activité trois fois supérieure à l'enzyme sauvage vis-à-vis de la formation du L-érythrulose. Le résidu Ala29 étant proche du groupement phosphate du ThDP chez la TK, une mutation de ce résidu en Asp ou en Glu pourrait modifier la charge du groupement phosphate du ThDP et ainsi avoir une influence positive sur le mécanisme catalytique de la TK. Ces deux mutations pourraient également mieux positionner le ThPP par rapport au substrat.

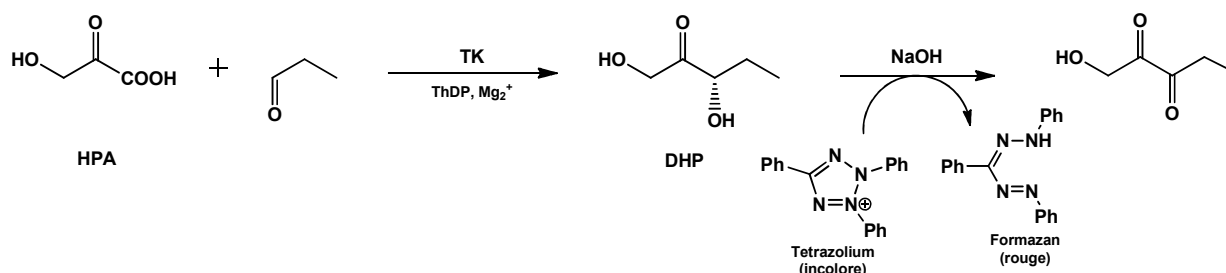
Les TK His281Ser, Arg520Val présentent une activité 4.8 fois et 3.6 fois supérieure à l'enzyme sauvage. Les résidus His281 et Arg520 sont en interaction chez l'enzyme sauvage avec le groupement phosphate du substrat naturel. La disparition de la charge et le plus faible encombrement stérique des His281Ser et Arg520Val induisent une amélioration de l'activité de l'enzyme mutée vis-à-vis du glycolaldéhyde.

La TK Arg520stop conduit à des résultats inattendus. En effet, par cette mutation, l'enzyme se trouve amputée de son domaine C-terminal et de 20 résidus de son domaine Pyr. Malgré cette modification importante, cette enzyme conserve son activité et présente même une activité 3,6 fois supérieure à l'enzyme sauvage.

#### 5.3.2.2. Amélioration de la spécificité pour les substrats aldéhydiques accepteurs non $\alpha$ -hydroxylés et aliphatiques.

Les banques de TK mutées qui ont été générées visent à améliorer l'activité de la TK de *E. coli* vis-à-vis des substrats non phosphorylés aliphatiques (non  $\alpha$ -hydroxylés) et plus particulièrement vis-à-vis du propionaldéhyde<sup>117</sup>. Le test de criblage utilisé repose sur la quantification de 1,3-dihydroxypentane-2-one (DHP) en présence de tétrazolium et de soude conduisant à la formation de formazan.





**Figure 68 : Test basé sur la formation du DHP**

Ce test de criblage a permis d'identifier des enzymes mutées présentant une meilleure activité vis-à-vis du propionaldéhyde par rapport à l'enzyme sauvage (Tableau 16).

Stratégie	Enzyme	Activité relative*
-	Enzyme sauvage	1
Phylogénétique	Ala29Glu	3,4
Structurale	Arg520Val	4,7
	Asp469Thr	4,9
	Asp269Tyr	4,4
	His26Ala	2,3
	His26Thr	2,2

(\* : activité spécifique vis-à-vis de la formation du DHP)

**Tableau 16 : TK mutées présentant les meilleures activités vis-à-vis de la formation du DHP**

Certaines TK mutées présentent des mutations identiques à celle identifiées précédemment lors du criblage en présence du glycolaldéhyde comme substrat accepteur. Par exemple, les TK mutées Ala29Glu et Arg520Val identifiées dans l'étude précédente comme plus performantes que l'enzyme sauvage pour la formation du L-érythrulose, présentent vis-à-vis de la formation de la DHP respectivement des activités 3.4 supérieure et 4.7 fois supérieure à l'enzyme sauvage.

De nouvelles TK mutées présentant des activités intéressantes vis-à-vis du propionaldéhyde ont pu être identifiées. Ainsi les TK Asp269 Thr et Asp269Tyr présentent une activité 5 fois supérieure et les TK His26Ala et His26Thr une activité 2 fois supérieure à l'enzyme sauvage. Les résidus Asp269 et His26 étant en interaction avec l'hydroxyle du carbone 2 du substrat accepteur dans le site actif de l'enzyme, la mutation de ces résidus par un résidu non chargé peut expliquer l'amélioration de l'activité vis-à-vis d'un aldéhyde non  $\alpha$ -hydroxylé, comme le propionaldéhyde.

#### 5.3.2.3. Modification de la stéréospécificité en présence de substrats accepteurs non $\alpha$ -hydroxylés.

Les banques de mutants obtenues par saturation de site sur les résidus His26 et Asp469 ont été analysées grâce à deux tests de criblage<sup>118</sup>. D'une part, un test colorimétrique basé sur la formation de formazan a été réalisé afin de déterminer la quantité de DHP formé en présence de propionaldéhyde et d'autre part, une analyse par HPLC chirale a permis de déterminer l'*ee* du DHP formé. A l'issue de ce double criblage, la TK His26Tyr présente une stéréosélectivité inversée avec un *ee* de 88 % en faveur de l'énantiomère de configuration *R*.

## 6. Conclusion

L'analyse de la bibliographie montre que la structure tridimensionnelle de la TK de levure et de son site actif ainsi que son mécanisme catalytique ont été largement étudiés. De puis peu, l'étude de la structure de la TK d'*E. coli* indique une forte analogie du site actif avec celui de la TK de levure. Il est donc envisageable de modifier la spécificité de substrat de ces TK selon des méthodes rationnelles basées sur la modification des interactions entre l'enzyme et le substrat. Jusqu'alors la spécificité de substrat de la TK de *E. coli* a été modifiée vis-à-vis de substrats accepteurs non phosphorylés, non  $\alpha$ -hydroxylés et hydrophobes par mutagenèse dirigée au niveau d'un ou de quelques résidus du site actif afin de limiter la taille des banques. En effet, le seul test utilisé pour le criblage est un test colorimétrique en présence des extraits cellulaires obtenus à partir de chacun des clones de la banque.



## **Résultats et discussion**



# CHAPITRE I : SYNTHÈSE DES SONDÉS

Dans cette partie nous allons présenter les stratégies et les résultats obtenus dans le cadre de la synthèse des sondes présentant d'une part le motif requis pour la mise au point du test de sélection avec la TK sauvage (cétose *D-thréo*) et pour la sélection des TK mutées, (aldoses *D-thréo* pour le transfert d'un groupement formyle et cétooses *L-érythro* pour l'inversion de configuration du carbone en  $\beta$  du groupe carbonyle) et d'autre part la chaîne latérale d'un acide aminé ( $R_4$ ).

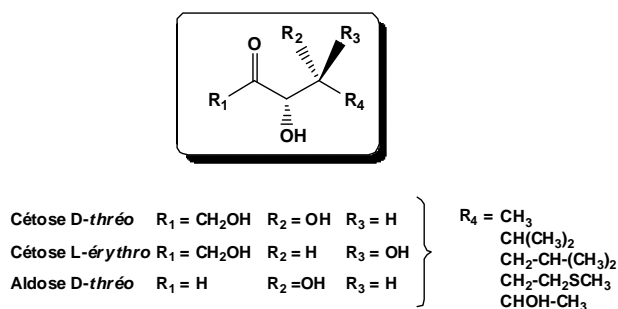


Figure 69 : Structure des sondes

Nous avons choisi la nature des chaînes latérales des acides aminés ( $R_4$ ) en fonction de différents paramètres qui dépendent de la spécificité de la TK:

- (1) une chaîne linéaire pour tenir compte tenu de la faible activité de la TK en présence de sondes portant un cycle ( $R_4 = \text{tyrosine}$ )<sup>4</sup> ou un bicyclic ( $R_4 = \text{umbelliférone}$ ) selon des travaux antérieurs menés au laboratoire<sup>3</sup> ;
- (2) une chaîne aliphatique non ramifiée ( $R_4 = \text{CH}_3$ , groupement le plus simple), ramifiée ( $R_4 = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$ , proche du groupe carbonyle, site réactif de ces composés ou plus éloignée ( $R_4 = \text{CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$ ) ou encore comportant un hétéroatome ( $R_4 = \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{SCH}_3$  et  $R_4 = \text{CHOH-CH}_3$ ).

Le premier objectif est d'étudier l'activité de la TK de levure vis-à-vis de ces composés (cétose *D-thréo*) qui diffèrent par la nature de la chaîne latérale plus ou moins encombrée et/ou hydrophobe et qui n'ont jamais été envisagés comme substrats donneurs de la TK.

Un autre objectif est de développer le test de sélection en présence des sondes précurseurs des acides aminés pour lesquels l'auxotrophie est accessible: la leucine ( $R_4 = \text{CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$ ) et la méthionine ( $R_4 = \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{SCH}_3$ ). Dans l'optique d'utiliser cette stratégie pour la sélection de TK mutées les sondes présentant les motifs *L-érythro* et aldoses *D-thréo* ainsi que les chaînes latérales de la leucine et de la méthionine seront synthétisées.

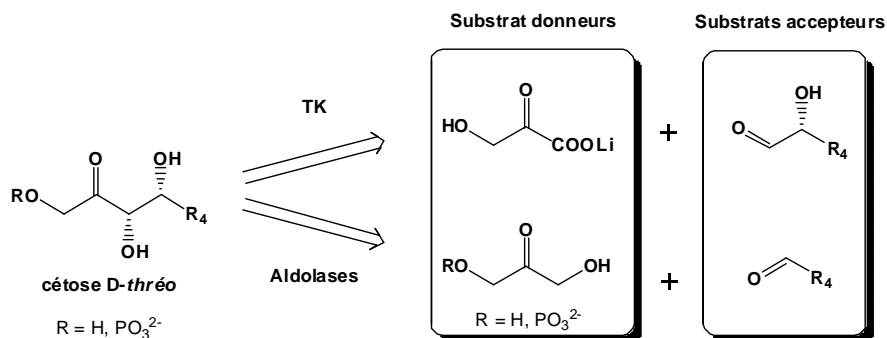
# 1. Synthèse des sondes présentant le motif cétose D-thréo

Les sondes présentant le motif cétose D-thréo dont la synthèse a été envisagée sont indiquées ci-dessous :

Motif (R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> , R <sub>3</sub> )				Chaîne latérale (R <sub>4</sub> )				
				Alanine	Valine	Leucine	Méthionine	Thréonine
Nom	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> -CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> SCH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> OH-CH <sub>3</sub>
Cétose D-thréo	CH <sub>2</sub> OH	OH	H	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>

**Tableau 17** : Sondes envisagées pour la mise au point du test de sélection.

Le motif cétose D-thréo (3*S*, 4*R*) est accessible par voie enzymatique en utilisant des enzymes catalysant la formation stéréospécifique de liaison C-C (Figure 70). Cette approche permet de créer en une étape les centres chiraux souhaités selon une réaction d'addition nucléophile d'un cétole (substrat donneur) sur un aldéhyde (substrat accepteur). Plus précisément, il peut s'agir soit de réactions d'aldolisation grâce à l'utilisation d'enzymes appartenant à la classe des lyases comme les aldolases soit de réactions de transfert d'un cétole sur une fonction aldéhyde catalysée par les transférases, classe à laquelle appartient la TK.



**Figure 70** : Voies de rétrosynthèse chimioenzymatique conduisant au motif cétose D-thréo

L'intérêt de ces voies de synthèse chimioenzymatique est de limiter les étapes de protection et déprotection des différentes fonctions et de permettre ainsi d'accéder à ces composés en peu d'étapes tout en apportant la chiralité souhaitée. Notre objectif est de tester les différentes enzymes susceptibles de conduire au motif recherché pour déterminer la voie la plus efficace pour la préparation des sondes. Il est à noter qu'en raison du mécanisme des réactions catalysées par la TK et par les aldolases, un aldéhyde accepteur  $\alpha$ -hydroxylé est nécessaire dans le cas de la TK et dans le cas des aldolases, un aldéhyde comportant un carbone de moins est requis.

De plus, l'utilisation de la TK comme catalyseur pour la synthèse des sondes en présence des substrats donneurs et accepteurs requis nous renseignera sur la faisabilité de la première étape du test de sélection qui est basée sur l'utilisation du produit de cette même réaction comme substrat de la TK (Figure 71).

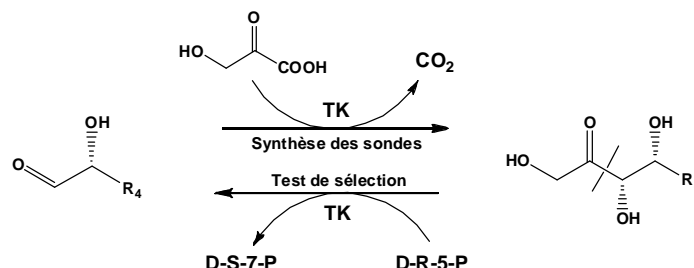


Figure 71 : Réversibilité de la réaction catalysée par la TK

## 1.1. Stratégies chimioenzymatiques

L'objectif est d'obtenir à l'échelle préparative les sondes requises pour se concentrer ensuite sur les tests *in vitro* et *in vivo*. Les conditions réactionnelles des voies de synthèse catalysées par la TK et par les aldolases sont exposées ci après.

### 1.1.1. Stratégies impliquant la transcétolase

La condensation du HPA sur l'aldéhyde accepteur catalysée par la TK en présence de ThDP, cofacteur de la TK, consomme un proton par cycle. L'augmentation du pH est en partie compensée par la libération de CO<sub>2</sub> (provenant de la décarboxylation du HPA) qui réagit avec les ions OH<sup>-</sup> pour former des ions bicarbonates<sup>119</sup>. Cependant le pH dépassant la valeur de 7,5 (pH optimum de la TK), celui-ci peut être maintenu à 7,5 en utilisant un tampon ou en l'ajustant à l'aide d'une solution acide au cours de la réaction (au moyen d'un pHstat par exemple).

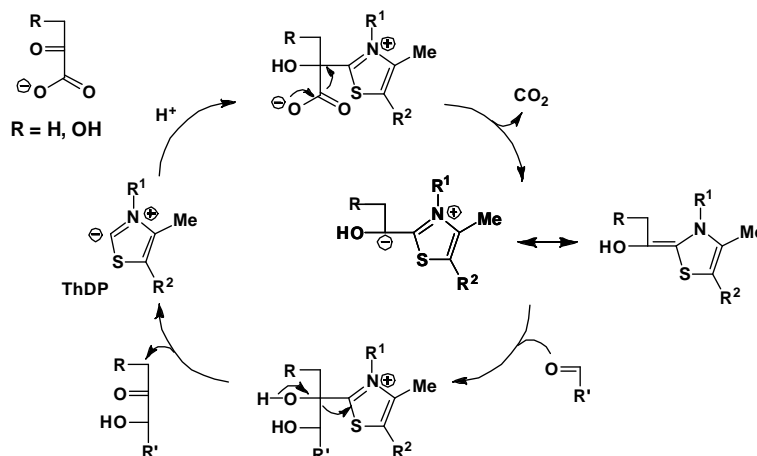
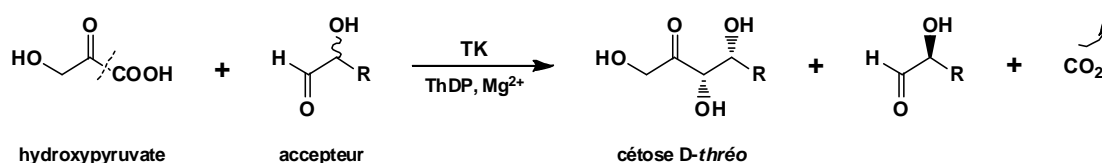


Figure. 72 : Mécanisme réactionnel des transférases et des ligases utilisant le ThDP comme cofacteur



Dans ces conditions, la TK présente l'avantage de conduire à des cétooses phosphorylés ou non (en fonction du type d'aldéhyde accepteur) en présence d'un substrat donneur (HPA) peu coûteux qui permet de rendre la réaction irréversible. La TK est utilisée en synthèse en raison de sa tolérance vis-à-vis d'une grande variété de substrats accepteurs non naturels<sup>120</sup>. De plus, comme elle est énantiosélective vis-à-vis d'aldéhydes accepteurs  $\alpha$ -hydroxylés de configuration *R*, elle permet de contrôler la configuration du carbone 4 au niveau du produit de la réaction en présence d'un mélange racémique d'aldéhydes  $\alpha$ -hydroxylés (Figure 73). Compte tenu des résultats obtenus dans la littérature, à l'issue de la réaction, les aldéhydes  $\alpha$ -hydroxylés de configuration *S* purifiés conduisent à des excès énantiomériques (ee) supérieurs à 95 %<sup>119</sup>.



**Figure 73 : Réaction catalysée par la TK en synthèse organique**

La TK utilisée dans le cadre des synthèses est la TKL1 sauvage de levure surexprimée dans la levure. Elle est préparée au laboratoire et utilisée sous forme d'extrait cellulaire brut (activité totale : 5 à 20 U/mL ; activité spécifique : 3 à 8 U/mg de protéines).

#### 1.1.1.1. Conditions réactionnelles

En se basant sur les données de la littérature<sup>119</sup> et le savoir-faire du laboratoire, des conditions standards ont été fixées pour la réalisation des synthèses des cétooses *D-thréo* en présence de TK. La TK étant énantiosélective, l'aldéhyde  $\alpha$ -hydroxylé accepteur a pu être utilisé sous forme racémique. La concentration en aldéhyde accepteur a été fixée à 100 mM dans le cas d'un aldéhyde énantiomériquement pur et à 200 mM dans le cas d'un aldéhyde racémique. Le substrat donneur (HPA ;  $K_m = 33 \text{ mM}$ <sup>84</sup>) est quant à lui introduit en quantité équimolaire par rapport à l'aldéhyde (*R*).

La quantité d'enzyme utilisée varie de 1 à 2 unités de TK par millilitre de milieu réactionnel. Ces synthèses à l'échelle préparative ont été réalisées dans un volume de 20 à 40 mL (2 à 4 mmoles de substrat accepteur) afin d'obtenir en théorie 250 à 500 mg de produit.

Le pH du milieu réactionnel est contrôlé et régulé par ajout d'une solution acide au cours du temps grâce à un pHstat. La réaction est suivie au cours du temps par le volume de solution acide ajoutée et par le dosage spectrophotométrique du HPA en présence d'une enzyme auxiliaire, la L-lactate déshydrogénase (LDH) et de son cofacteur le NADH.

#### 1.1.1.2. Substrat donneur : l'acide hydroxypyruvique (HPA)

L'hydroxypyruvate **10**, n'est pas commercial, il est préparé en une étape au laboratoire à partir de l'acide bromopyruvique **9** (commercial ou préparé à partir du pyruvate) selon la méthode décrite par Turner et Woodley<sup>121</sup>. L'utilisation de deux équivalents de lithine (LiOH) en solution aqueuse à pH 9 permet de substituer l'atome de brome par une fonction hydroxyle et d'obtenir le produit final sous forme de sel de lithium (Figure 74).

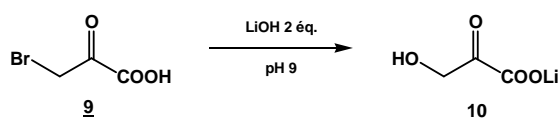


Figure 74 : Synthèse de l'acide hydroxypyruvique

Le produit est obtenu sans purification sous la forme d'un solide dont la pureté est estimée par dosage enzymatique au moyen de la L-lactate déshydrogénase (LDH). Au final, l'hydroxypyruvate de lithium est obtenu avec une pureté de 61 % et un rendement de 72 %.

#### 1.1.1.3. Substrats accepteurs : les aldéhydes $\alpha$ -hydroxylés

Les voies impliquant la TK nécessitent l'utilisation d'aldéhydes  $\alpha$ -hydroxylés comme substrat accepteur. Leurs synthèses seront décrites ultérieurement pour chaque type de chaîne latérale envisagée. La TK étant énantiosélective un mélange racémique peut être utilisé lors des synthèses.

### 1.1.2. Stratégies impliquant les aldolases

Les aldolases sont classées en deux groupes selon leur mécanisme d'action (Figure 75). Les aldolases de classe I activent le substrat donneur en formant un intermédiaire covalent du type base de Schiff. Les aldolases de classe II contiennent dans le site actif un ion  $Zn^{2+}$  qui va faciliter la formation d'un énolate sur le substrat donneur.

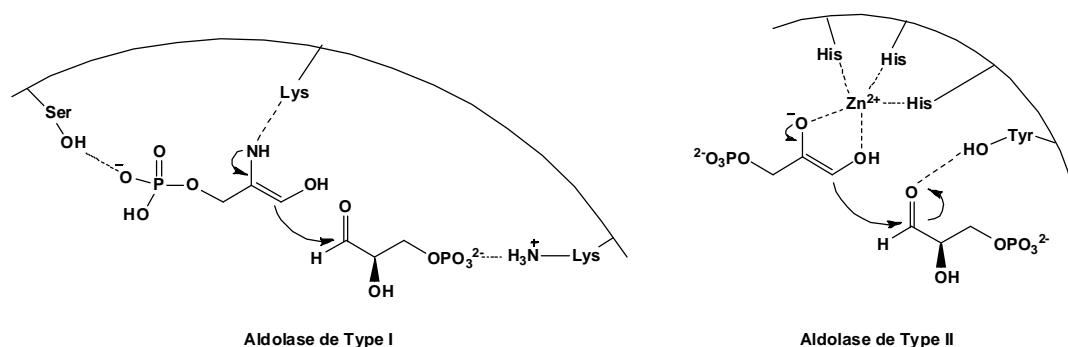


Figure 75 : Mécanismes des aldolases de type I et de type II

Les aldolases se distinguent également en fonction du substrat donneur naturel impliqué dans la réaction. Celui-ci peut être la dihydroxyacétone phosphate (DHAP), la dihydroxyacétone (DHA), le pyruvate, le phosphoénolpyruvate, la glycine ou encore l'acétaldéhyde. L'intérêt majeur de ces enzymes est qu'elles acceptent une grande variété de substrats accepteurs non naturels (hydroxylés ou non en  $\alpha$  et présentant des groupements R hydrophobes ou non), ce qui a permis de les utiliser pour accéder à un large panel d'analogues de monosaccharides.

Nous allons nous intéresser plus particulièrement aux DHAP et DHA aldolases qui appartiennent à la classe I et qui permettent d'accéder à des cétooses respectivement phosphorylés ou non en position 1.

#### 1.1.2.1. Les DHAP aldolases

La DHAP aldolase la plus utilisée en synthèse organique est la fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FDPA) qui a permis d'accéder à de nombreux cétooses et analogues de configuration (3*S*, 4*R*)<sup>122</sup> depuis les travaux initiés par Effenberger et Wong en 1990<sup>123</sup> et 1991<sup>124</sup>.

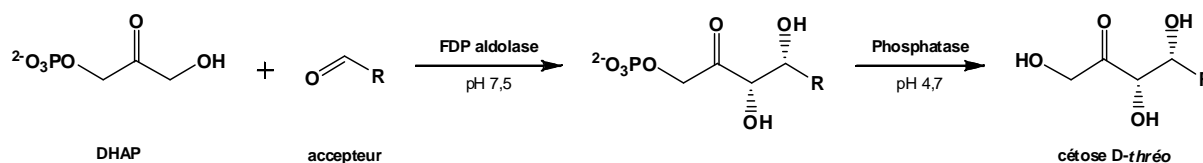


Figure 76 : Réaction catalysée par la FDP aldolase en synthèse organique

La FDP aldolase catalyse la condensation de la DHAP, substrat donneur, sur un aldéhyde accepteur. Une étape d'hydrolyse du groupement phosphate du cétoose obtenu est catalysée par la phosphatase à pH 4,7 (Figure 76). Lors des synthèses, nous utilisons une FDP aldolase commerciale extraite de muscle de lapin (activité totale : 230 à 460 U/mL ; activité spécifique : 10 à 20 U/mg de protéines) et une phosphatase acide commerciale extraite de germe de blé.

#### ➤ Conditions réactionnelles

D'après les conditions décrites dans la littérature<sup>125,126</sup> et le savoir-faire du laboratoire, des conditions standards ont été fixées pour la réalisation des synthèses des cétooses D-thréo en présence de FDP aldolase. La concentration en substrat donneur, le DHAP ( $K_m = 2$  mM<sup>127</sup>), a été fixée à 100 mM. Le substrat accepteur est introduit en excès à une concentration comprise entre 150 et 250 mM (soit 1,5 à 2,5 équivalents) dans le but d'obtenir une

conversion totale de la DHAP. En effet, en fin de réaction, la vitesse de la réaction diminue à cause de la faible concentration en DHAP. Un excès de substrat accepteur est donc introduit afin de déplacer l'équilibre vers la formation du cétose et ainsi obtenir la conversion totale de la DHAP. La quantité d'enzyme utilisée varie de 5 à 10 unités de FDP aldolase par millilitre de milieu réactionnel. Ces synthèses à l'échelle préparative ont été réalisées dans un volume de 25 à 50 mL (ce qui correspond à 2,5 à 5 mmol de substrat donneur) dans le but d'obtenir théoriquement 250 à 500 mg de produit.

Le pH du milieu réactionnel a été maintenu à 7,5 grâce à l'introduction de tampon Trizma<sup>®</sup> ou de triéthanolamine (TEA). Ces synthèses ont été suivies au cours du temps par le dosage spectrophotométrique de la DHAP en présence d'une enzyme auxiliaire, la  $\alpha$ -glycérophosphate déshydrogénase ( $\alpha$ -GPDH) et de son cofacteur le NADH. L'étape finale de déphosphorylation (catalysée par la phosphatase acide à pH 4,7) est suivie par RMN <sup>31</sup>P.

➤ Substrat donneur : la dihydroxyacétone phosphate (DHAP)

La DHAP est un substrat donneur essentiel pour plusieurs aldolases. Bien qu'elle soit commerciale, son coût est beaucoup trop élevé pour des applications en synthèse. Plusieurs stratégies ont été développées au laboratoire<sup>128-129</sup> pour accéder à ce composé.

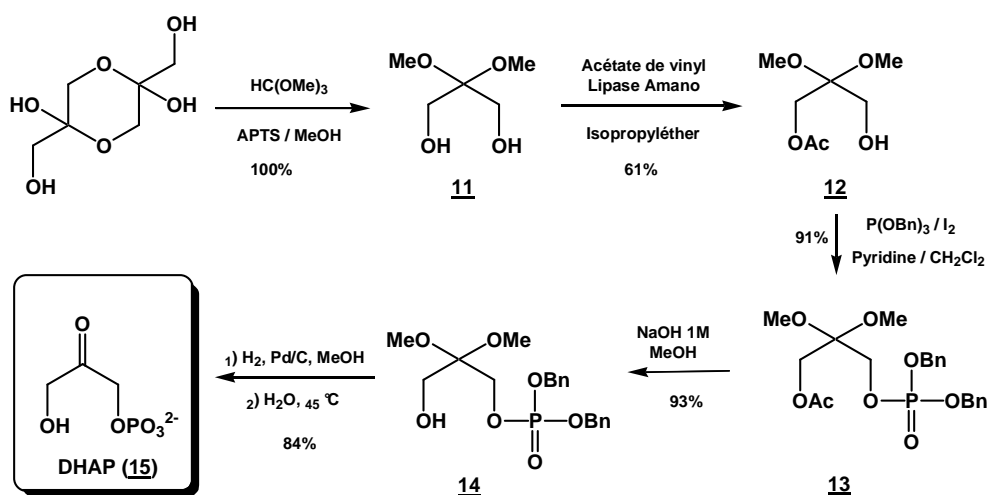


Figure 77 : Synthèse chimioenzymatique de la DHAP à partir de la DHA

La DHAP que nous avons utilisée pour les synthèses des sondes a été obtenue en 5 étapes à partir de la DHA selon une stratégie développée au laboratoire<sup>128</sup> (Figure 77) qui implique une désymétrisation de la DHA par une lipase puis une phosphorylation de la fonction alcool libre et une saponification de l'ester.

A l'issue de la dernière étape, l'acétal est hydrolysé dans l'eau à 35 °C grâce à l'acidité du groupement phosphate libéré au préalable par hydrogénolyse. La réaction est suivie par dosage spectrophotométrique de la DHAP en présence de  $\alpha$ -GPDH et de NADH à 340 nm. Après 50 minutes, le rendement maximum atteint est de 84 %. Après ajustement du pH à 3,7, la solution de DHAP est conservée à – 20 °C.

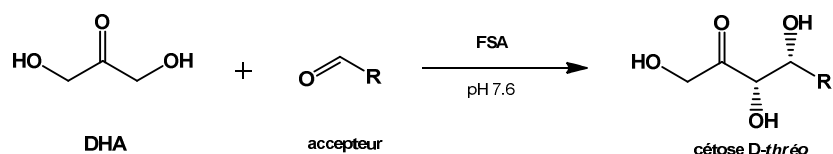
➤ Substrats accepteurs : les aldéhydes

Les voies de synthèse des cétooses D-thréo **1** à **5** catalysées par les DHAP aldolases nécessitent des aldéhydes (commerciaux) comportant un carbone de moins par rapport à ceux utilisés avec la TK.

1.1.2.2. Les DHA aldolases

Une DHA aldolase, la fructose-6-phosphate aldolase (FSA)<sup>130</sup> a été découverte assez récemment. Cette enzyme est utilisée depuis peu de temps au laboratoire grâce à une collaboration avec le Pr. Sprenger (Université de Stuttgart). Nous ne disposions pas de cette enzyme au début de cette thèse. La spécificité de substrat de cette enzyme étant peu connue, il nous a semblé intéressant dans le cadre de nos travaux d'étudier son potentiel synthétique en présence des aldéhydes testés avec la FDP aldolase.

Cette enzyme, comme la FDP aldolase, conduit à des cétooses de configuration (3*S*, 4*R*), mais elle utilise la DHA comme substrat donneur, composé commercial et peu coûteux, contrairement à la DHAP, substrat donneur des DHAP aldolases. De plus, cette enzyme conduit donc en une étape à des cétooses dont le groupe hydroxyle en position 1 est libre (Figure 78). La FSA a été utilisée récemment pour préparer la fagomine<sup>131</sup>. Sa spécificité vis-à-vis du substrat donneur et de l'aldéhyde accepteur est en cours d'exploration<sup>132</sup>.



**Figure 78 : Réaction catalysée par la FSA en synthèse organique**

La FSA utilisée lors de nos synthèses est surexprimée dans *E. coli* et préparée au laboratoire. Cette enzyme thermostable est purifiée partiellement par choc thermique et obtenue après lyophilisation sous forme de poudre (activité totale : 2 à 3 U/ mg de poudre). Il s'agit d'une FSA mutée (A129S) obtenue par l'équipe de Sprenger<sup>133</sup> et qui possède une meilleure affinité et une meilleure activité vis-à-vis de la DHA par rapport à l'enzyme sauvage<sup>134</sup> (Tableau 18).

	$K_M$ DHA (mM)	$V_{max}$ DHA (U/mg)	$k_{cat}/K_M$ DHA ( $m M^{-1}.s^{-1}$ )
FSA sauvage	35	45	5
FSA A129S	6,3	104	63

**Tableau 19 : Constantes cinétiques de la DHA pour la FSA sauvage et la FSA A129S**

➤ Conditions réactionnelles

À partir d'essais réalisés à l'échelle analytique, des conditions standards ont été fixées pour la réalisation des synthèses en présence de FSA A129S. La concentration en substrat donneur, la DHA, a été fixée à 50 mM ( $K_M$  du DHA = 6,3 mM). Le substrat accepteur a été introduit à une concentration de 150 mM (soit 1,5 équivalent) afin d'obtenir une conversion totale de la DHA en fin de réaction. La quantité d'enzyme utilisée varie de 3 à 6 unités de FSA par millilitre de milieu réactionnel. Le pH du milieu réactionnel est tamponné par le tampon glycyl glycine contenu dans l'extrait de FSA. Contrairement au HPA et à la DHAP, la disparition de la DHA peut être visualisée par CCM. Le suivi des réactions catalysées par la FSA a donc été effectué par cette méthode.

Le taux de surexpression de la FSA mutée étant élevée, il est possible de la produire en quantité importante. Les synthèses à l'échelle préparative sont réalisées dans un volume de 50 à 100 mL (ce qui correspond à 2,5 à 5 mmol de substrat donneur) de façon à obtenir théoriquement de 500 mg à 1 g de cétooses D-thréo.

➤ Substrats donneurs et accepteurs :

Le substrat donneur (DHA) et les substrats accepteurs de la FSA permettant d'accéder aux sondes **1** à **5** (identiques à ceux utilisés avec la FDPA) sont commerciaux, ce qui représente un avantage certain pour cette stratégie.

### 1.1.3. Conclusion

Les conditions réactionnelles envisagées en présence des différentes enzymes sont indiquées dans le tableau ci-dessous.

Enzymes	TK	FDPA	FSA
Substrat donneur (mM)	100	100	50
Substrat accepteur (mM)	100 (R) - 200 (R,S)	150-250	150
Enzyme (U/mL de milieu réactionnel)	1-2	5-10	3-6
Volume réactionnel (mL)	20-40	25-50	50-100
Tampon ou pHstat	pHstat	Tampon (0,1M)	-

**Tableau 19 : Conditions réactionnelles utilisées pour les synthèses chimioenzymatiques**

## 1.2. Synthèse chimioenzymatique du composé **1**

Le composé **1** présente la chaîne latérale de l'alanine ( $R_4 = CH_3$ ). Sa synthèse a été envisagée selon les trois voies chimioenzymatiques présentées précédemment.

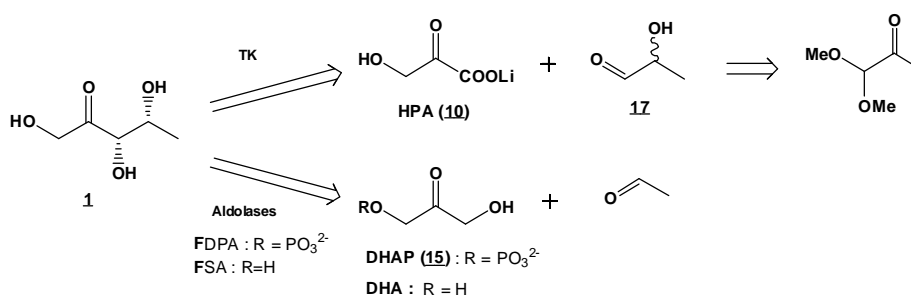


Figure 79 : Rétrosynthèse du composé **1**

La synthèse du composé **1** catalysée par la TK nécessite comme substrat accepteur le D,L-lactaldéhyde **17** et celles catalysées par les aldolases (FDPA et FSA) l'acétaldéhyde commercial (Figure 79).

### 1.2.1. Synthèse du composé **1** catalysée par la TK

#### 1.2.1.1. Synthèse du substrat accepteur **17**

Le D,L-lactaldéhyde **17** a été obtenu en deux étapes à partir du pyruvaldéhyde diméthylacétal (Figure 80).

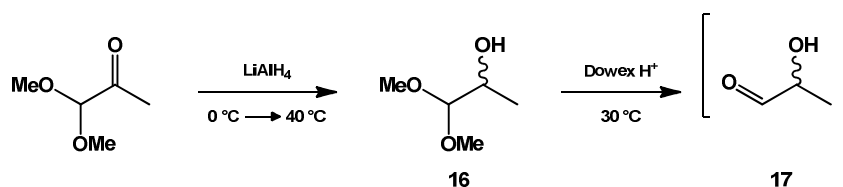


Figure 80 : Synthèse du substrat accepteur **17**

#### ➤ Première étape : Réduction de la fonction cétone du pyruvaldéhyde diméthylacétal

Cette réaction est effectuée en présence d'hydrure d'aluminium et de lithium ( $LiAlH_4$ ) dans l'éther. Après addition du pyruvaldéhyde diméthylacétal à  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ , le mélange réactionnel est porté à reflux de l'éther. Après deux heures de réaction, la disparition du pyruvaldéhyde diméthylacétal est vérifiée par chromatographie en couche mince (CCM). La présence du composé **16** est confirmée par l'analyse des spectres de RMN  $^1H$  (présence d'un multiplet à 3,59 ppm correspondant au proton du carbone portant le groupement hydroxyle et de deux

doublets à 1,03 et 3,96 ppm correspondant au groupement méthyle terminal et au proton du carbone qui porte la fonction acétale) et de RMN  $^{13}\text{C}$  (présence d'un carbone à 68,87 ppm correspondant au carbone portant la fonction alcool). Le D,L-lactaldéhyde diméthylacétal **16** est obtenu sans purification sous forme d'un liquide incolore avec un rendement de 73 %.

➤ Deuxième étape : Hydrolyse du groupement diméthylacétal

La fonction aldéhyde du composé **17** est générée par hydrolyse en conditions acides du groupement diméthylacétal du composé **17**. Cette réaction est réalisée dans l'eau en présence de résine Dowex  $\text{H}^+$  à 30 °C pendant une nuit. La disparition du composé **17** et l'apparition d'un seul autre composé est vérifiée par CCM. Après filtration de la résine et ajustement du pH à 7 par ajout de soude 1M, le composé est obtenu en solution aqueuse. Le rendement de cette étape est considéré comme quantitatif. Les composés aldéhydiques étant plus stables sous forme d'acétal, le D,L-lactaldéhyde **17** sera préparé avant chaque utilisation.

D'après l'expérience que nous avons au laboratoire de la synthèse des aldéhydes  $\alpha$ -hydroxylés nous savons que ces composés ont tendance à exister sous forme oligomérique. Il est difficile de les caractériser par RMN. Dans de nombreux cas la présence de l'aldéhyde est confirmée de façon indirecte grâce à la réaction catalysée par l'enzyme qui nous informe de la présence du produit de couplage attendu. Cette stratégie sera utilisée pour toutes les synthèses impliquant des aldéhydes  $\alpha$ -hydroxylés dans le cadre de ces travaux.

1.2.1.2. Réaction catalysée par la TK

Pour accéder au composé **1**, le transfert du groupement hydroxyacétyle de l'HPA sur le composé **17** est catalysé par la TK (Figure 81).

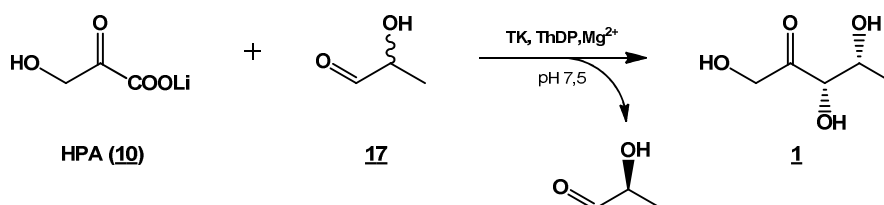
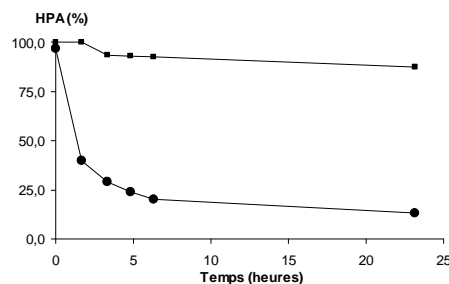


Figure 81 : Synthèse du composé **1** catalysée par la TK

Le contrôle du pH est effectué au pHstat par ajout d'une solution de HCl. Après 24 heures de réaction, l'ajout d'acide n'est plus nécessaire. De plus, le suivi de la réaction par dosage spectrophotométrique du HPA indique que sa concentration diminue rapidement au cours des 5 premières heures et n'évolue quasiment plus après 8 heures de réaction (Figure 79). Le taux de conversion du HPA compte tenu du témoin réalisé (milieu réactionnel en absence de TK) est de 74 %.





**Figure 82 : Suivi de la concentration en HPA au cours de la synthèse du composé 1 catalysée par la TK (■ : milieu réactionnel sans TK ; ●: réaction)**

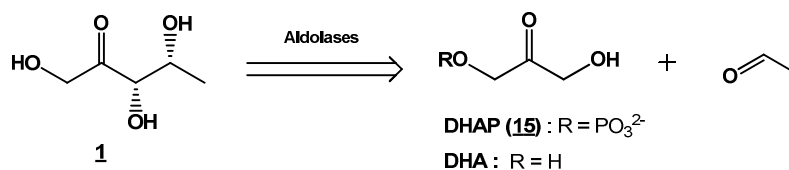
Afin de séparer le composé 1 du L-lactaldéhyde, une purification par chromatographie sur gel de silice est réalisée en présence d'un gradient cyclohexane / acétate d'éthyle (de 4 / 6 à 2 / 8). Le composé 1 est obtenu sous forme d'une huile visqueuse incolore avec un rendement de 31 %. L'analyse du spectre RMN  $^1\text{H}$  est conforme à celui décrit dans la littérature<sup>135</sup> et indique la présence de deux doublets à 4,43 et 4,53 ppm avec une constante de couplage de 19 Hz caractéristique du  $\text{CH}_2$  en  $\alpha$  du groupement carbonyle. De plus, l'analyse du spectre RMN  $^{13}\text{C}$  indique la présence d'un groupement carbonyle à 214,08 ppm.

#### 1.2.1.3. Conclusion

Cette voie chimioenzymatique a permis d'obtenir le composé 1 avec un rendement global modeste (23 % par rapport au D-pyruvaldéhyde diméthylacétal). Toutefois, il est à noter que cette stratégie conduit à la formation des deux carbones asymétriques en trois étapes seulement. De plus, la voie de synthèse catalysée par la TK nous a permis de montrer que l'aldéhyde 14 est un substrat accepteur de cette enzyme. Selon la réaction inverse, le produit de cette réaction, le cétose D-thréo 1 peut donc être envisagé comme substrat donneur de la TK dans le cadre du test de sélection.

#### 1.2.2. Synthèse du composé 1 catalysée par les aldolases

Le substrat accepteur des deux aldolases (FDPA et FSA) est l'acétaldéhyde, composé commercial (Figure 83).



**Figure 83 : Rétrosynthèse du composé 1**

#### 1.2.2.1. Synthèse catalysée par la FDP aldolase

Pour accéder au composé **1**, nous avons envisagé de condenser la DHAP **15** sur l'acétaldéhyde en présence de FDPA. L'hydrolyse du groupement phosphate est ensuite catalysée par la phosphatase acide (Figure 84).

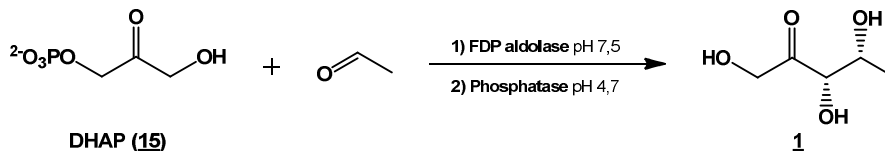


Figure 84 : Synthèse du composé **1** catalysée par la FDPA

L'acétaldéhyde n'étant pas totalement soluble en milieu aqueux, un cosolvant, le DMF (4%), a été introduit dans le milieu réactionnel.

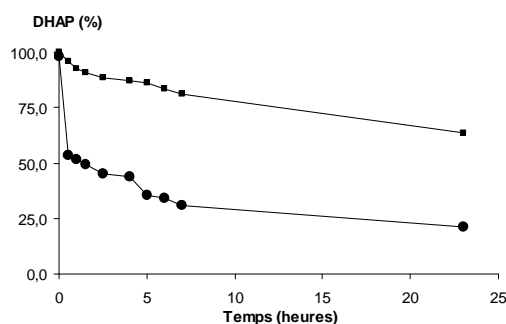


Figure 85 : Suivi de la concentration en DHAP au cours de la synthèse du composé **1** catalysée par la FDP aldolase (■ : milieu réactionnel sans FDPA ; ● : réaction)

Le témoin réalisé dans les conditions réactionnelles mais en l'absence de FDPA montre une perte de 34 % de la concentration initiale en DHAP en 24 heures. La DHAP est un composé instable en solution aqueuse à un pH supérieur à 4. Une étude de la stabilité de la DHAP à une concentration initiale de 80 mM en solution aqueuse à un pH de 7,5 montre une dégradation de 50 % en 24 heures à 25 °C<sup>136</sup>.

De plus après 24 heures de réaction, la concentration de la DHAP n'évolue plus. La conversion complète de la DHAP n'a pas été obtenue malgré l'ajout d'enzyme et d'acétaldéhyde au cours de la réaction (Figure 85). Un effet d'inhibition de l'acétaldéhyde ou du produit de la réaction pourrait expliquer ce résultat. Finalement, le taux de conversion de la DHAP en tenant compte du témoin est de 42 %. La déphosphorylation du produit de la réaction (non isolé) en présence de phosphatase acide est complète après 24 heures de réaction. Après purification par chromatographie sur gel de silice éclair (cyclohexane / acétate d'éthyle 4 / 6), le composé **1** est obtenu sous forme d'une huile visqueuse incolore avec un rendement de 14 %. Le produit est identifié par l'analyse des spectres RMN <sup>1</sup>H et RMN <sup>13</sup>C identiques à ceux obtenus précédemment avec la réaction catalysée par la TK.

#### 1.2.2.2. Synthèse catalysée par la FSA

Pour accéder au composé **1**, la condensation du DHA sur l'acétaldéhyde a été réalisée en présence de la FSA (A129S) (Figure 86).

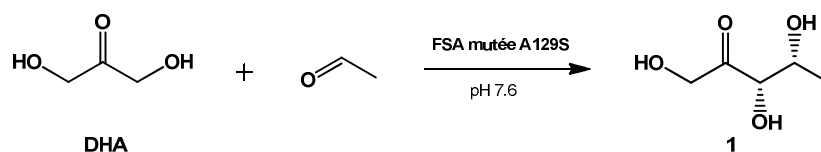


Figure 86 : Synthèse du composé **1** catalysée par la FSA

Après 24 heures de réaction, la DHA est totalement consommée comme l'indique le suivi par CCM. Après purification par chromatographie sur gel de silice éclair (dichlorométhane/ méthanol 95 / 5), le composé **1** est obtenu sous forme d'une huile visqueuse avec un rendement de 71 %. Le produit est identifié par l'analyse des spectres RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  identiques à ceux obtenus précédemment.

#### 1.2.3. Conclusion

Le composé **1** a été obtenu selon trois voies enzymatiques distinctes. La condensation de la DHA sur l'acétaldéhyde catalysée par la FSA mutée s'est révélée la voie la plus efficace (rendement = 71 %) et la plus rapide (une seule étape). Les deux autres voies ont conduit à des rendements beaucoup plus modestes (TK : 12 % et FDP aldolase : 14 %) avec un nombre d'étapes plus important.

### 1.3. Synthèse chimioenzymatique du composé **2**

Le composé **2** présente la chaîne latérale de la valine ( $\text{R}_4 = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ). La synthèse du composé **2** catalysée par la TK nécessite l'aldéhyde  $\alpha$ -hydroxylé racémique **24** et celles catalysées par les aldolases (FDPA et FSA), l'isobutyraldéhyde commercial (Figure 87).

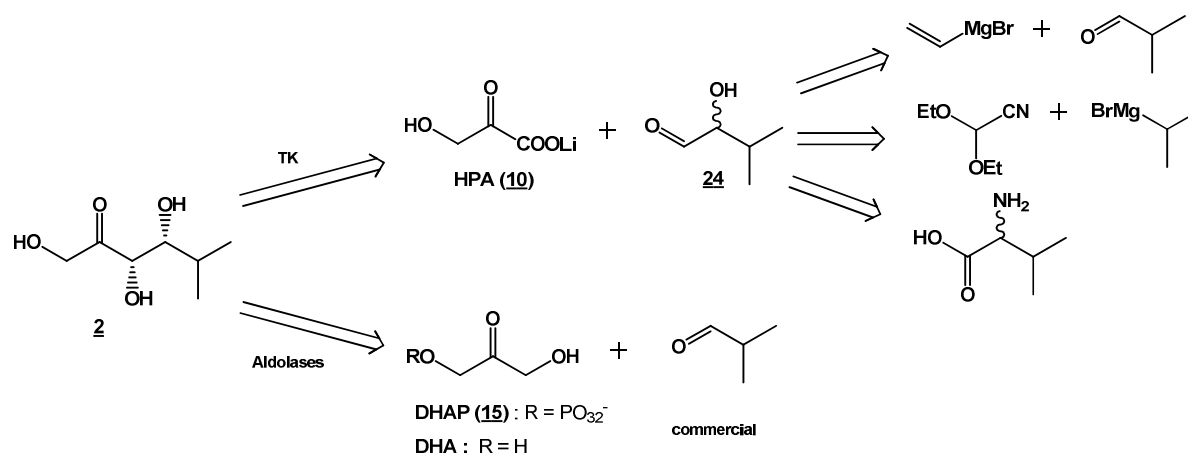


Figure 87 : Rétrosynthèse du composé **2**

### 1.3.1. Synthèse du composé **2** catalysée par la TK

#### 1.3.1.1. Synthèse du substrat accepteur **24**

L'accès au composé **24** a été envisagé selon trois stratégies (Figure 88). Les voies **A** et **B** font intervenir un organomagnésien. Dans la voie **A**, l'isobutyraldéhyde apporte le groupement isopropyle par condensation avec le vinyl magnésium. Dans la voie **B**, ce même groupement est introduit grâce à l'isopropyl magnésium qui va se condenser avec le diéthoxyacétonitrile. La voie **C** repose sur une stratégie développée par Turner<sup>137</sup> à partir de l'acide aminé correspondant, la D,L-valine.

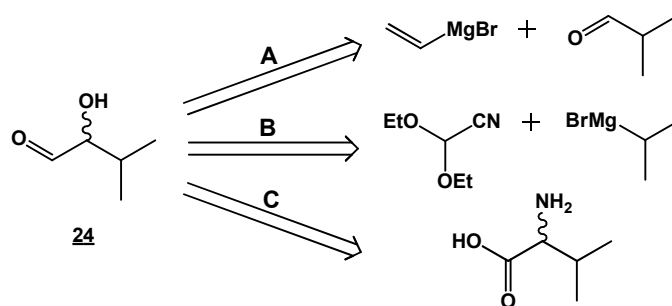


Figure 88 : Rétrosynthèse de l'aldéhyde **24**

#### ➤ Voie de synthèse **A**

Cette voie de synthèse est la plus rapide, elle nous permettrait d'accéder à l'aldéhyde **24** en deux étapes par ozonolyse de la double liaison de l'alcool allylique correspondant, le 4-méthyl-1-penten-3-ol, obtenu selon une réaction de Grignard à partir du bromure de vinyl magnésium et de l'isobutyraldéhyde.

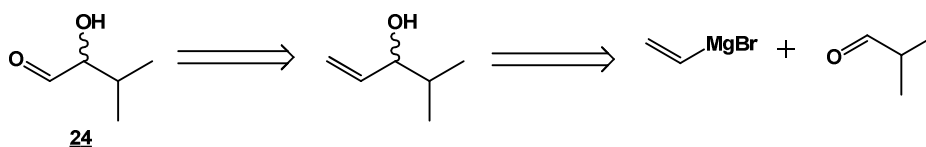


Figure 89 : Rétrosynthèse de l'aldéhyde **24** (voie A)

La réaction de Grignard ne nous a pas permis d'obtenir le 4-méthyl-1-penten-3-ol dans de bonnes conditions car la réaction n'est pas reproductible et les rendements faibles.

#### ➤ Voie de synthèse **B**

Dans cette autre approche, la fonction aldéhyde est générée lors de la déprotection du groupement diéthylacétal du composé **19** obtenu par réduction de la fonction cétone du composé **18**. L'obtention de ce dernier repose aussi sur une réaction de Grignard qui dans ce cas est réalisée en présence de l'isopropyl magnésium et de diéthoxyacétonitrile.

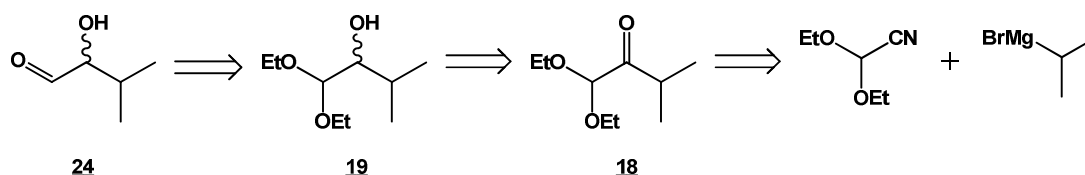


Figure 90 : Rétrosynthèse de l'aldéhyde **24** (voie B)

■ Synthèse du composé **18** : Le composé **18** a été obtenu par réaction de Grignard entre le diéthoxyacétonitrile et le bromure d'isopropyl magnésium selon un protocole décrit dans la littérature (Figure 91)<sup>138</sup>.

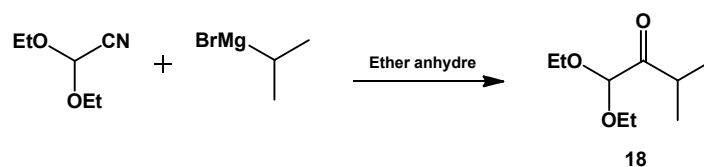


Figure 91 : Synthèse du composé **18**

Après addition lente du magnésien sur le diéthoxyacétonitrile dans l'éther anhydre, le mélange est laissé à 0 °C pendant deux heures. En fin de réaction, la fonction imine formée est hydrolysée en fonction cétone par ajout d'eau dans le milieu réactionnel (Figure 92).

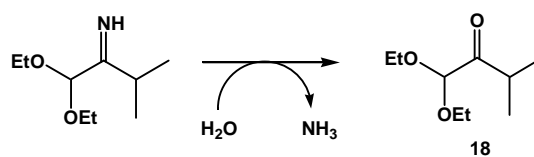


Figure 92 : Hydrolyse de la fonction imine en fonction cétone

Après purification par chromatographie sur gel de silice éclair (cyclohexane/ acétate d'éthyle 98 / 2), le produit est obtenu sous forme d'une huile incolore avec un rendement de 30 %. Le produit est identifié par l'analyse des spectres RMN <sup>1</sup>H (présence d'un singulet à 4,61 correspondant au proton de l'acétal) et RMN <sup>13</sup>C (présence d'un carbonyle à 209,6 ppm).

■ Synthèse du composé **19** : La réduction de la fonction cétone du composé **18** a été réalisée en présence de borohydrure de sodium dans le méthanol.

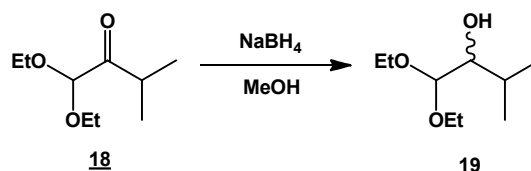


Figure 93 : Synthèse du composé **19**

Après addition du borohydrure de sodium par petites portions à 0 °C, la réaction est laissée sous agitation une nuit à température ambiante. Le suivi de la réaction par CCM

confirme la disparition de **18** et l'apparition d'autres composés parmi lesquels nous n'avons pas pu isoler le composé **19** attendu. Cette voie de synthèse n'a pas été poursuivie compte tenu des difficultés rencontrées lors de ces deux premières étapes.

➤ Voie de synthèse C

Nous avons alors envisagé une approche moins rapide, en 5 étapes, décrite par Turner<sup>137</sup> à partir de la D,L-valine. La stratégie consiste à générer le groupement hydroxyle et la fonction aldéhyde du composé **24** respectivement à partir de la fonction amine (par désamination nitreuse) et de l'acide carboxylique (*via* un ester éthylique) de la D,L-valine. La protection de la fonction alcool du composé **22** sera nécessaire pour réaliser l'étape de réduction de l'ester qui permettra d'obtenir la fonction aldéhyde (Figure 94).

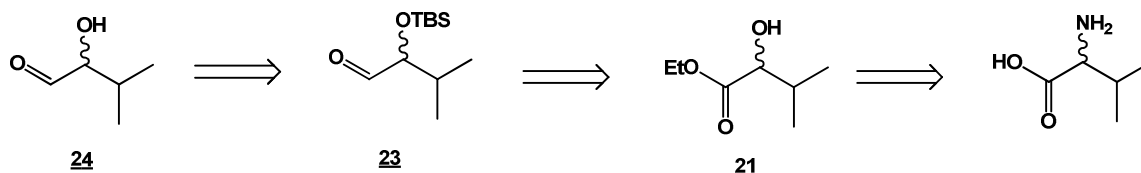


Figure 94 : Rétrosynthèse de l'aldéhyde **24** (voie C)

■ Désamination nitreuse de la D,L-valine. Cette réaction de substitution nucléophile d'un groupement amine par un groupement hydroxyle via la formation d'un diazonium est réalisée en présence de nitrite de sodium en milieu acide. Le diazonium formé à basse température conduit à un carbocation qui est ensuite attaqué par une molécule d'eau pour donner un groupement hydroxyle.

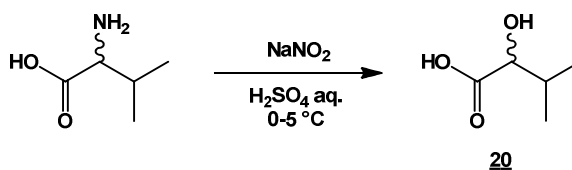


Figure 95 : Désamination nitreuse de la D,L-valine

Lors de la désamination nitreuse des acides aminés, la fonction carboxyle en  $\alpha$  de l'amine permet une rétention de configuration via un intermédiaire de type oxonium<sup>139</sup> (Figure 96). Dans le cas de la valine, nous avons utilisé un racémique et donc le problème de rétention de configuration ne se pose pas, mais dans le cas d'acide aminé énantiomériquement pur, il est possible par cette voie d'obtenir l'acide  $\alpha$ -hydroxylé énantiomériquement pur correspondant.

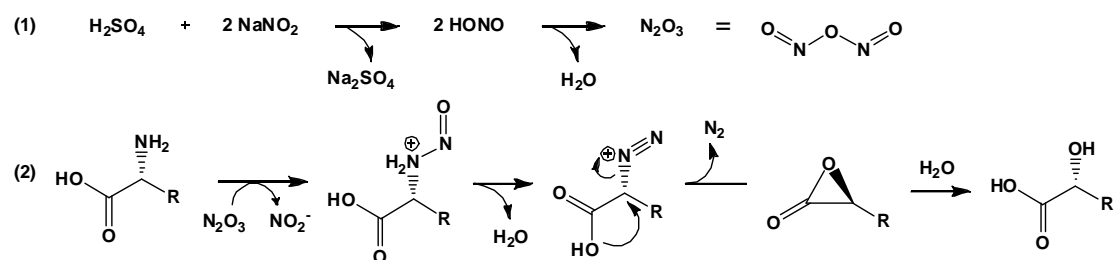


Figure 96 : Mécanisme de la désamination nitreuse des acides aminés

Après addition lente de la solution de nitrite de sodium à 0 °C, la réaction est laissée à température ambiante pendant une nuit. La fin de la réaction est confirmée par la disparition complète de la D,L-valine en CCM (isopropanol / H<sub>2</sub>O). Après extraction à l'éther et lavage au pentane, l'acide  $\alpha$ -hydroxylé **20** est obtenu sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 52 %. La présence du groupement hydroxyle est confirmée par l'analyse des spectres RMN <sup>1</sup>H (disparition du proton de la fonction amine à 3,29 ppm et apparition du proton de l'atome de carbone portant le groupe hydroxyle à 3,93 ppm) et <sup>13</sup>C (disparition du carbone portant l'amine à 60,5 ppm et apparition du carbone portant l'hydroxyle à 76,3 ppm).

■ Estérification de la fonction carboxyle du composé 20 : L'estérification du composé **20** est réalisée selon le protocole décrit par Effenberger<sup>140</sup>.

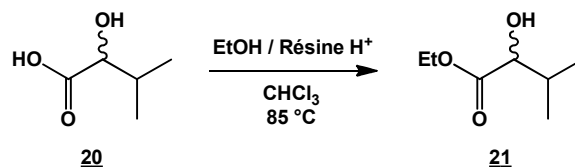


Figure 97 : Estérification de la fonction carboxyle du composé **20**

La réaction est réalisée en présence de résine acide dans un mélange d'éthanol absolu et de chloroforme (Figure 97). Sachant que l'azéotrope eau / éthanol possède une température d'ébullition de 78 °C, le milieu réactionnel est placé à 85 °C et la réaction est rendue totale par condensation des vapeurs à travers du tamis moléculaire activé. Le milieu réactionnel est laissé à reflux pendant deux jours. Après filtration de la résine et évaporation des solvants sous pression réduite, le composé **21** est obtenu sous forme d'un liquide translucide brunâtre avec un rendement de 95 %. L'estérification du groupement carboxyle est confirmée par l'analyse des spectres <sup>1</sup>H RMN (présence d'un triplet à 1,29 ppm et d'un quadruplet à 4,25 ppm correspondant au groupement méthyle de l'ester) et <sup>13</sup>C RMN (présence de deux carbones à 14,4 ppm et 61,7 ppm correspondant au groupement éthyle de l'ester).

■ Protection de la fonction hydroxyle du composé **21**. Afin de protéger le groupement hydroxyle du composé **21**, un éther de silyle a été utilisé dans la stratégie décrite par Turner<sup>137</sup>.

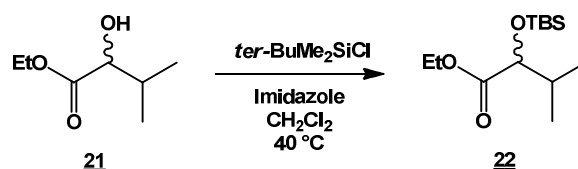


Figure 98 : Protection de la fonction hydroxyle du composé **21**

La réaction a été effectuée dans le dichlorométhane anhydre en présence d'imidazole et de chlorure de *ter*-butyldiméthylsilyle (Figure 98). Après l'addition des réactifs à température ambiante, la réaction est laissée à reflux du dichlorométhane pendant une nuit. Après purification sur gel de silice éclair, le produit est obtenu sous forme d'un liquide incolore avec un rendement de 84 %. L'analyse du spectre RMN <sup>1</sup>H montre la présence de trois singulets à 0,03 ; 0,05 et 0,91 ppm correspondant respectivement aux deux groupements méthyles et au groupement *ter*-butyle portés par l'atome de silicium. L'analyse du spectre RMN <sup>13</sup>C indique des déplacements caractéristiques des substituants de l'atome de silicium à – 5,2 et – 4,8 ppm correspondant aux deux groupements méthyles et à 18,46 et 25,8 ppm correspondant au groupement *ter*-butyle.

■ Réduction partielle de la fonction ester du composé **22** : La réduction partielle de la fonction ester en fonction aldéhyde a été réalisée par l'hydrure de diisobutylaluminium à – 78 °C dans le dichlorométhane.

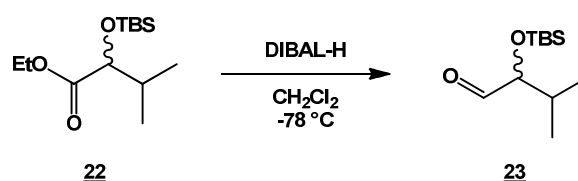


Figure 99 : Réduction partielle de la fonction ester du composé **22**

Après une addition lente de l'hydrure de diisobutylaluminium, la réaction est maintenue à – 78 °C pendant une heure et demie. Après purification sur gel de silice éclair, le produit est obtenu sous la forme d'un liquide incolore avec un rendement de 90 %. La présence du composé **20** est confirmé par l'analyse des spectres <sup>1</sup>H RMN (proton aldéhydique à 9,6 ppm et disparition de l'éthyle de l'ester à 1,27 et 4,17 ppm) et <sup>13</sup>C RMN (apparition d'un carbonyle à 205,1 ppm et disparition du carbonyle de l'ester à 173,7 ppm).



➤ Déprotection de la fonction hydroxyle du composé **23**

D'après la littérature, les éthers silylés peuvent être déprotégés en conditions acides ou en présence de fluorure (acide fluorhydrique, fluorure de potassium ou fluorure de tétrabutylammonium) (Figure 100). Nous avons envisagé ces deux méthodes.

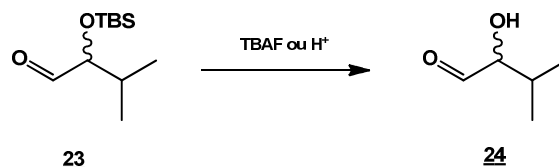


Figure 100 : Obtention du composé **24** en conditions acides ou en présence de TBAF

■ Déprotection en présence de fluorure de tétrabutylammonium : Cette réaction a été réalisée dans le THF en présence de fluorure de tétrabutylammonium (TBAF) à 0 °C et a conduit à la formation d'un produit majoritaire et à de nombreux sous-produits qu'il nous été impossible de séparer par chromatographie. Cette stratégie de déprotection a donc été abandonnée.

■ Déprotection en conditions acides. La déprotection de l'éther silylé en conditions acides (Tableau 20).

Acide	Solvant(s)	Température	Composés présents en fin de réaction		
			<b>23</b>	<b>24</b>	Sous-produits non caractérisés
Dowex H <sup>+</sup>	eau	25 °C	+	-	+
	eau / éthanol (3/7)	35 °C	+	-	+
	eau / DMF (8/2)	35 °C	-	-	+
HCl	HCl 4N	35 °C	-	-	+
	HCl 1N	35 °C	+	+	+
	HCl 1N /THF (1/3)	50 °C	-	+	-

(+ : composé présent ; - : composé absent)

Tableau 20 : Conditions réactionnelles testées pour la déprotection du composé **23**

Dans un premier temps, des essais de déprotection ont été réalisés en milieu aqueux en présence de résine Dowex H<sup>+</sup>. En effet, l'utilisation d'un solvant organique nécessiterait une étape d'évaporation qui n'est souvent pas compatible avec la fragilité des aldéhydes α-hydroxylés. Ainsi, l'aldéhyde obtenu en solution aqueuse peut être utilisé directement pour l'étape enzymatique suivante. Le composé **23** étant peu soluble dans l'eau, nous avons introduit un cosolvant, l'éthanol ou le DMF. Nous avons alors observé l'apparition de nombreux sous-produits sans que le composé **23** ne disparaisse totalement. Aucune des différentes conditions testées en présence de Dowex H<sup>+</sup> ne nous a conduit à l'obtention d'un produit majoritaire.

En présence d'acide chlorhydrique 4N nous constatons une dégradation du composé **23**. L'utilisation d'acide chlorhydrique 1N conduit à la formation d'un nouveau composé mais à une disparition partielle du composé **23**. Finalement, nous avons utilisé un mélange binaire tétrahydrofurane/acide chlorhydrique 1N qui nous a permis de faire disparaître totalement le composé **23** et d'obtenir un composé majoritaire. Cependant, l'élimination du tétrahydrofurane sous pression réduite est nécessaire. Nous avons ainsi obtenu une solution aqueuse que nous avons utilisée pour l'étape de couplage avec la TK. Dans ces conditions, la déprotection du composé **23** peut être considérée comme quantitative. Ces conditions acides de déprotection nous permettent de nous affranchir d'une étape de purification requise avec le TBAF en raison des produits secondaires

### ➤ Conclusion

Parmi les trois voies envisagées pour accéder à l'aldéhyde **24**, seule la voie basée sur la stratégie Turner<sup>137</sup> nous a permis d'obtenir le composé désiré sous forme protégée (composé **23**) en 4 étapes avec un rendement global de 37 %. L'étape critique s'est révélée être la déprotection de l'éther silylé conduisant au composé **24**. Les meilleures conditions de déprotection nous ont permis d'obtenir ce composé en présence d'un mélange binaire tétrahydrofurane/acide chlorhydrique 1N.

Cette stratégie offre l'avantage de pouvoir être généralisée pour l'obtention des autres aldéhydes  $\alpha$ -hydroxylés (envisagés comme substrats de la TK) à partir des acides aminés correspondants sous forme racémique ou énantiomériquement purs (dont nous aurons besoin pour la validation du test de sélection *in vivo*).

#### 1.3.1.2. Couplage enzymatique réalisé par la TK

Pour accéder au composé **2**, le transfert du groupement hydroxyacétyle du HPA sur le composé **24** est catalysé par la TK (Figure 101).

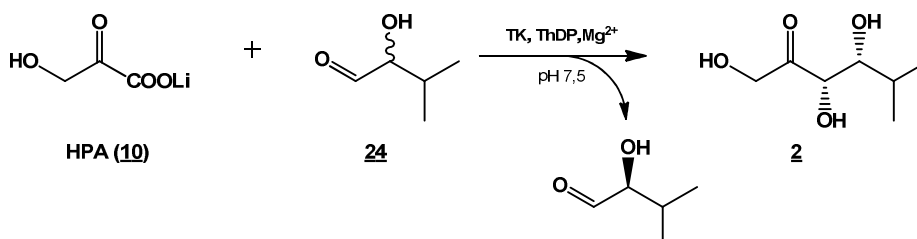
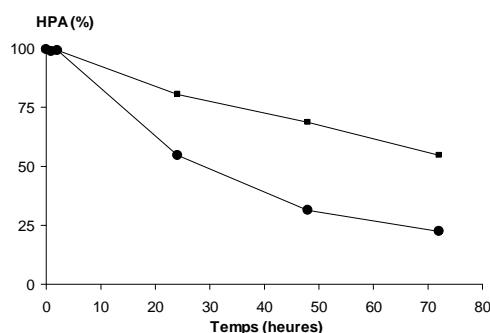


Figure 101 : Synthèse du composé **2** catalysée par la TK

La synthèse du composé **2** est réalisée selon les conditions standards définies précédemment. Afin de faciliter la solubilisation de l'aldéhyde, un cosolvant, le DMF est

ajouté au milieu réactionnel (20 %). Cette teneur est compatible avec l'activité de l'enzyme selon des études antérieures menées au laboratoire. Après 72 heures de réaction, l'ajout d'acide n'est plus nécessaire et la concentration en HPA déterminée par le dosage spectrophotométrique n'évolue plus malgré l'introduction de TK (Figure 102). Le taux de conversion du HPA (compte tenu du témoin réalisé en l'absence de TK) est de 33 %. L'instabilité de l'HPA est plus visible (le temps de réaction étant plus long que lors des expériences précédentes) et elle est due à une décarboxylation spontanée déjà décrite dans la littérature<sup>119</sup>.



**Figure 102 : Suivi de la concentration en HPA au cours de la synthèse du composé 2 catalysée par la TK (■ : milieu réactionnel sans TK ; ●: réaction)**

Après une purification par chromatographie sur gel de silice (cyclohexane / acétate d'éthyle 3 / 7), le composé 2 est obtenu avec un rendement inférieur à 5 %. L'analyse du spectre RMN <sup>1</sup>H indique la présence de deux doublets à 4,44 et 4,58 ppm avec une constante de couplage de 19 Hz caractéristique du CH<sub>2</sub> en α du groupement carbonyle. De plus, l'analyse du spectre RMN <sup>13</sup>C indique la présence d'un groupement carbonyle à 211,3 ppm.

### 1.3.1.3. Conclusion

Cette voie chimioenzymatique en présence de la TK nous a permis d'obtenir le composé 2 en six étapes avec un très faible rendement global qui peut être expliqué par :

(1) la présence d'un groupement isopropyle par son encombrement et son caractère hydrophobe semble donc défavorable à l'activité de la TK. Ce résultat avait été souligné dans la littérature<sup>119</sup> en présence d'un substrat analogue comportant un groupement *ter*-butyle encore plus encombré. Une vitesse relative quatre fois plus faible que celle obtenue avec le lactaldéhyde (R = CH<sub>3</sub>) a été mentionnée mais ce résultat n'avait jamais été confirmé à l'échelle préparative.

(2) le précurseur de l'aldéhyde 23, protégé par un groupement silyle est volatile, cet aspect est décrit dans la littérature par Turner<sup>137</sup>. De ce fait, la concentration attendue après déprotection de l'aldéhyde 24 utilisé comme substrat accepteur, est certainement surestimée.

Nous avons donc cherché à obtenir ce composé en plus grande quantité selon les deux autres voies catalysées par les aldolases.

### 1.3.2. Synthèse du composé **2** par les aldolases

Le substrat accepteur des deux aldolases (FDPA et FSA) est l'isobutyraldéhyde, composé commercial. Dans le cas de la FDPA, le substrat donneur est la DHAP **15**, dans le cas de la FSA, le substrat donneur est la DHA (Figure 103).

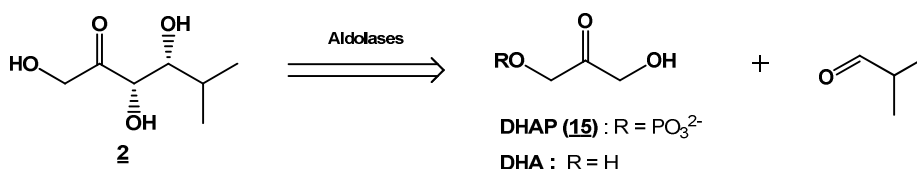


Figure 103 : Rétrosynthèse du composé **2** catalysée par les aldolases

#### 1.3.2.1. Synthèse catalysée par la FDP aldolase

Pour accéder au composé **2** en présence de FDP aldolase, la DHAP doit se condenser sur l'isobutyraldéhyde. L'hydrolyse du groupement phosphate est ensuite catalysée par la phosphatase acide (Figure 104).

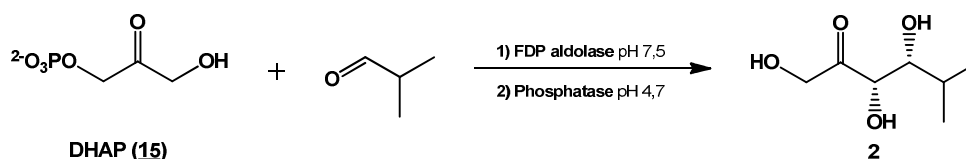


Figure 104 : Synthèse du composé **2** catalysée par la FDPA

Cette synthèse a uniquement été réalisée à l'échelle analytique (2 à 4 mL) en milieu aqueux tamponné à pH 7,5 (TEA 0,1 M) contenant 20 % de DMF afin de faciliter la solubilisation de l'isobutyraldéhyde. Nous avons fait varier le nombre d'équivalents du substrat accepteur (de 1 à 2 équivalents soit 50 mM à 100mM). La réaction est suivie par le dosage de la DHAP au cours du temps. Après 5 heures de réaction, le taux de conversion est de 30 % et n'évolue pratiquement plus.

L'isobutyraldéhyde est mentionné dans la littérature comme étant un mauvais substrat de la FDPA<sup>125-126</sup> conduisant à une faible vitesse relative (10 % par rapport à l'acétaldéhyde). Dans de nombreux cas de telles vitesses relatives permettent néanmoins d'obtenir le produit de la réaction. Nos résultats montrent que la faible activité de la FDPA en présence de l'isobutyraldéhyde ne permet pas d'isoler le composé attendu. Nous avons alors testé l'autre aldolase dont nous disposons maintenant au laboratoire, la FSA.

### 1.3.2.2. Synthèse catalysée par la FSA

Pour accéder au composé **2**, nous avons également envisagé de condenser la DHA sur l'isobutyraldéhyde en présence de la FSA A129S (Figure 105).

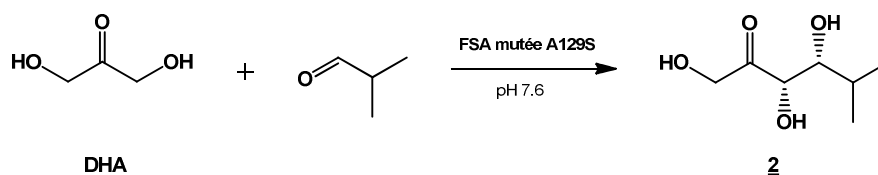


Figure 105 : synthèse du composé **2** catalysée par la FSA

Cette synthèse a été réalisée selon les conditions standards évoquées précédemment dans un volume de 100 mL en présence de 2,5 unités de FSA par millilitre de volume réactionnel en présence et en l'absence de cosolvant (cette enzyme est souvent plus efficace en milieu biphasique quand le substrat est insoluble dans l'eau). La réaction est suivie par CCM (dichlorométhane / méthanol 85 / 15). Après 48 heures de réaction, quelque soit les conditions réactionnelles, la DHA n'est visiblement pas consommée. L'isobutyraldéhyde ne semble donc pas être substrat de la FSA A129S.

### 1.3.3. Conclusion

Parmi les trois voies testées, seule la voie catalysée par la TK a permis d'obtenir le composé **2** avec un rendement global très faible. Le groupement isobutyle des aldéhydes envisagés comme substrats accepteurs de la TK ou des aldolases est donc défavorable à l'activité de ces enzymes et pourrait gêner l'attaque nucléophile du carbonyle par le substrat donneur. Le composé **2** ne sera donc pas envisagé comme substrat donneur de la TK.

## 1.4. Synthèse chimioenzymatique du composé **3**

Le composé **3** présente la chaîne latérale de la leucine ( $R = \text{CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$ ). La synthèse du composé **3** catalysée par la TK nécessite l'aldéhyde  $\alpha$ -hydroxylé de configuration (*R*) **29** comme substrat accepteur. La voie reposant sur l'utilisation d'aldolases a été envisagée en présence de l'isovaléraldéhyde comme substrat accepteur (Figure 106).

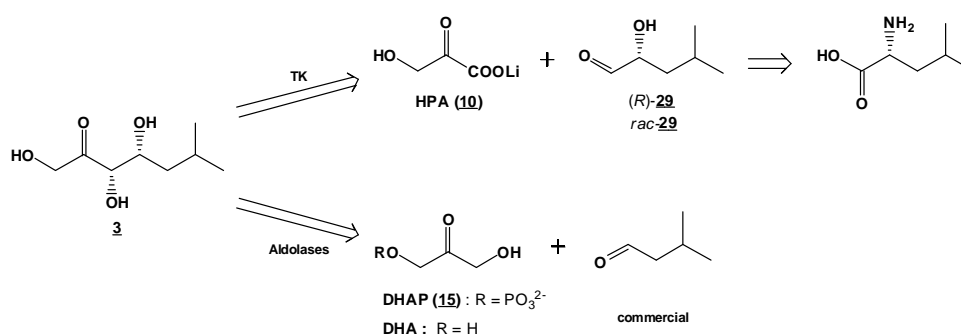


Figure 106 : Rétrosynthèse du composé **3**

### 1.4.1. Synthèse du composé par la TK

#### 1.4.1.1. Synthèse du substrat accepteur

L'accès au composé **29** a été envisagé à partir de l'acide aminé correspondant, la leucine selon la voie de synthèse décrite précédemment pour l'obtention de l'aldéhyde **24** à partir de la D,L-valine (Figure 107). Cette synthèse n'a pas été conduite à partir d'un mélange racémique mais indépendamment à partir de la D-leucine et de la L-leucine, car les énantiomères *R* et *S* de l'aldéhyde **29** seront nécessaires pour l'étude du test de sélection. L'énantiomère *R* du composé **29** sera utilisé comme substrat de la TK pour l'accès au composé **3**.

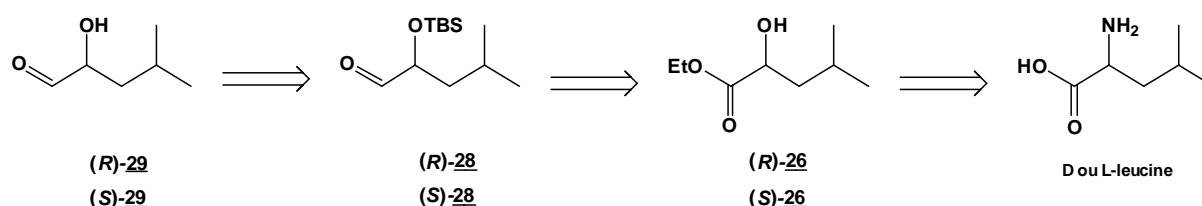


Figure 107 : Rétrosynthèse de l'aldéhyde **29**

#### ➤ Désamination nitreuse de la D-leucine et de la L-leucine :

Comme nous l'avons mentionné précédemment, la désamination nitreuse des acides aminés permet d'obtenir les acides  $\alpha$ -hydroxylés correspondants avec une rétention de configuration grâce à un état intermédiaire de type oxonium.

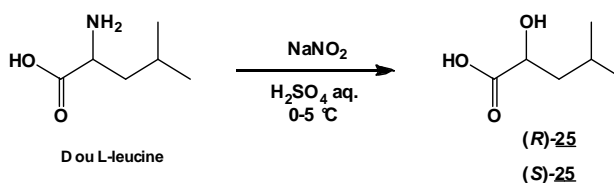


Figure 108 : Désamination nitreuse de la leucine

Nous avons donc envisagé d'obtenir les composés (*R*)-**25** et (*S*)-**25** par désamination nitreuse à partir de la D-leucine et de la L-leucine respectivement. Après addition lente de la solution de nitrite de sodium à 0 °C, la réaction est laissée à température ambiante pendant une nuit. La fin de la réaction est confirmée par la disparition complète de la leucine en CCM (isopropanol / H<sub>2</sub>O 7/3). Après extraction à l'éther et lavage au pentane, les acides  $\alpha$ -hydroxylés (*R*)-**25** et (*S*)-**25** sont obtenus sous forme d'un solide blanc avec des rendements respectifs de 62 % et 81 %. La présence du groupement hydroxyle est confirmée par l'analyse des spectres RMN <sup>1</sup>H (disparition du proton de la fonction amine à 3,47 ppm et apparition du proton du carbone portant le groupe hydroxyle à 4,32 ppm) et <sup>13</sup>C (disparition du carbone

portant la fonction amine à 54,2 ppm et apparition du carbone portant le groupe hydroxyle à 68,9 ppm). Les pouvoirs rotatoires des composés (*R*)-**25** et (*S*)-**25** sont respectivement de +26,1° et – 26,4°.

➤ Estérification de la fonction carboxyle du composé 25:

L'estérification du composé **25** est réalisée selon le protocole décrit par Effenberger<sup>140</sup>.

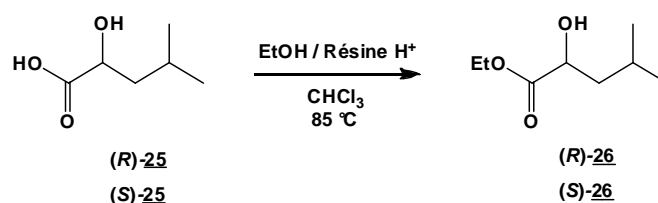


Figure 109 : Estérification de la fonction carboxyle du composé **25**

La réaction est réalisée en présence de résine acide dans un mélange d'éthanol absolu et de chloroforme (Figure 109) selon la méthode décrite précédemment. Le milieu réactionnel est laissé à reflux pendant deux jours. Après filtration de la résine et évaporation des solvants sous pression réduite, les composés (*R*)-**26** et (*S*)-**26** sont obtenus sous forme d'un liquide translucide brunâtre avec des rendements respectifs de 97 % et 99 %. L'estérification du groupement carboxyle est confirmée par l'analyse des spectres <sup>1</sup>H RMN (présence d'un triplet à 1,25 ppm et d'un multiplet à 4,25 ppm correspondant au groupement éthyle de l'ester) et <sup>13</sup>C RMN (présence de deux carbones à 14,2 ppm et 61,6 ppm correspondant au groupement éthyle de l'ester).

➤ Protection de la fonction hydroxyle du composé 26 :

Afin de protéger le groupement hydroxyle du composé **26**, nous avons utilisé un éther de silyle.

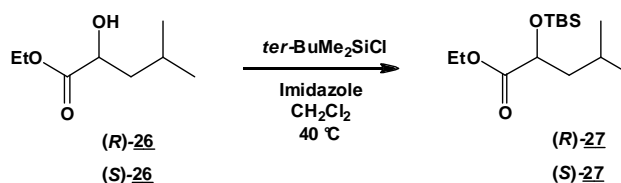


Figure 110 : Protection de la fonction hydroxyle du composé **26**

La réaction a été effectuée dans le dichlorométhane anhydre en présence d'imidazole et de chlorure de *ter*-butyldiméthylsilyle (Figure 110). Après addition des réactifs à température ambiante, la réaction est laissée à reflux du dichlorométhane pendant une nuit. Après purification sur gel de silice éclair, les composés (*R*)-**27** et (*S*)-**27** sont obtenus sous forme d'un liquide incolore avec des rendements respectifs de 90 % et 81 %. L'analyse du spectre

RMN  $^1\text{H}$  montre la présence de trois singulets à 0,06 ; 0,08 et 0,96 ppm correspondant respectivement aux deux groupements méthyles et au groupement *ter*-butyle portés par l'atome de silicium. L'analyse du spectre RMN  $^{13}\text{C}$  indique des déplacements caractéristiques des substituants de l'atome de silicium à - 5,4 et - 4,8 ppm correspondant aux deux groupements méthyles et à 18,3 et 25,6 ppm correspondant au groupement *ter*-butyle. Les pouvoirs rotatoires des composés (*R*)-**27** et (*S*)-**27** sont respectivement de + 36,6° et - 37,1 °C

➤ Réduction partielle de la fonction ester du composé **27**.

La réduction partielle de la fonction ester en fonction aldéhyde a été réalisée par l'hydruire de diisobutylaluminium lithium ou à - 78 °C dans le dichlorométhane (Figure 111).

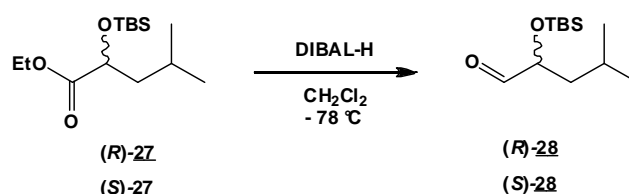


Figure 111 : Réduction partielle de la fonction ester du composé **27**

Après une addition lente de l'hydruire de diisobutylaluminium lithium, la réaction est maintenue à - 78 °C pendant deux heures. Après purification sur gel de silice éclair, les composés (*R*)-**28** et (*S*)-**28** sont obtenus sous la forme d'un liquide incolore avec des rendements respectifs de 90 % et 80 %. La réduction de la fonction ester en fonction aldéhyde est confirmée par l'analyse des spectres  $^1\text{H}$  RMN (proton aldéhydique à 9,58 ppm et disparition du  $\text{CH}_3$  à 1,25 et du  $\text{CH}_2$  4,22 ppm de l'ester) et  $^{13}\text{C}$  RMN (apparition d'un carbonyle à 204,3 ppm et disparition du carbonyle de l'ester à 174,4 ppm). Les pouvoirs rotatoires des composés (*R*)-**28** et (*S*)-**28** n'étant pas décrits dans la littérature, leurs puretés énantiomériques sont confirmées par la comparaison de leurs pouvoirs rotatoires qui sont respectivement de + 50,4° et - 49,3°.

➤ Déprotection de la fonction hydroxyle du composé **28**

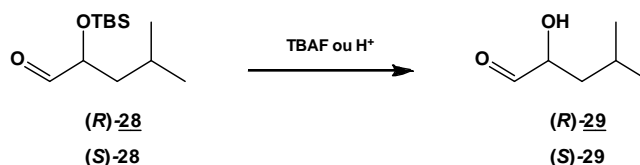


Figure 112 : Déprotection de la fonction hydroxyle du composé **28**

Nous avons envisagé les deux méthodes précédemment décrites: en conditions acides et en présence de fluorure de tétrabutylammonium.



■ Déprotection en présence de fluorure de tétrabutylammonium : Cette réaction de déprotection a été réalisée dans le tétrahydrofurane en présence de fluorure de tétrabutylammonium (TBAF) à 0 °C. Après addition lente de la solution de TBAF, la réaction est maintenue à 0 °C pendant deux heures. D'après le suivi par CCM des réactions conduites avec les énantiomères *R* et *S* du composé **28**, dans chaque cas un produit majoritaire est apparu que nous avons purifié. Après purification sur colonne de silice les deux composés sont obtenus sous forme d'une cire blanche avec des rendements respectifs de 68 % et 64 %. La déprotection de la fonction alcool est confirmée par la disparition des signaux caractéristiques du groupement *ter*-butyldiméthylsilyle au niveau des spectres RMN <sup>1</sup>H (disparition des pics à 0,06 et 0,09 ppm) et <sup>13</sup>C (disparition des pics à – 4,5 et – 5 ppm).

Pour les raisons évoquées précédemment, la fonction aldéhyde n'est pas visible en RMN, ces composés étant présents sous forme oligomérique. La présence du composé (*R*)-**29** sera confirmée de façon indirecte par la réaction catalysée par la TK.

■ Déprotection en conditions acides : La déprotection de l'éther silylé en conditions acides été envisagée selon les deux méthodes indiquées ci-dessous (Tableau 21).

Acide	Solvant(s)	Température	Composé présents en fin de réaction		
			<b>28</b>	<b>29</b>	Sous-produits non caractérisés
Dowex H <sup>+</sup>	eau	40 °C	+	+	+
HCl	HCl 1N /THF (1/1)	40 °C	-	+	+

(+ : composé présent ; - : composé absent)

**Tableau 21 : Conditions réactionnelles testées pour la déprotection du composé **28****

Dans un premier temps, des essais de déprotection en milieu aqueux ont été réalisés en présence de résine Dowex H<sup>+</sup> de façon à utiliser l'aldéhyde formé (*R*) directement pour la réaction catalysée par la TK. Cependant, nous avons observé l'apparition d'un nouveau produit sans que le composé **28** ne disparaisse totalement.

Finalement, nous avons réalisé des essais de déprotection en présence d'acide chlorhydrique dilué. Nous avons utilisé un mélange binaire tétrahydrofurane/acide chlorhydrique 1N qui nous a permis de faire disparaître totalement le composé **28** et d'obtenir un composé majoritaire avec quelques sous-produits. Après évaporation du tétrahydrofurane sous pression réduite, nous avons obtenu une solution aqueuse contenant le composé **29** (la déprotection de la fonction alcool a été confirmée par RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C). Le composé (*R*)-**29** a été utilisé pour l'étape de couplage avec la TK.

### ➤ Conclusion

La stratégie développée à partir de la D-leucine et de la L-leucine nous a permis d'obtenir les aldéhydes  $\alpha$ -hydroxylés protégés (*R*)-**28** et (*S*)-**28** en quatre étapes avec des rendements globaux respectifs de 49 % et 52 %. L'étape critique s'est révélée être la déprotection de l'éther silylé. La réaction catalysée par la TK nous renseignera sur la présence de l'aldéhyde (*R*)-**29**

#### 1.4.1.2. Réaction catalysée par la TK

Pour accéder au composé **3**, le transfert du groupement hydroxyacétyle du HPA sur le composé **29** (*R*) est catalysé par la TK (Figure 113).

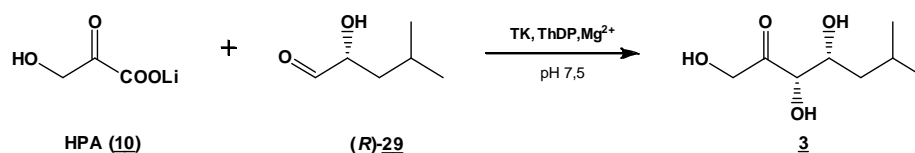
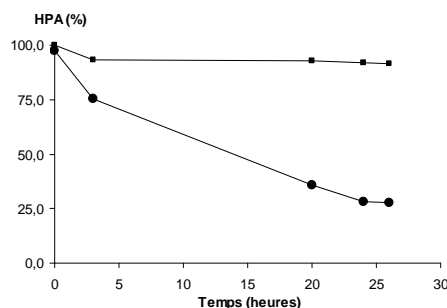


Figure 113 : Synthèse du composé **3** en présence de TK

La synthèse du composé **3** est réalisée selon les conditions standards définies précédemment. Afin de faciliter la solubilisation de l'aldéhyde, un cosolvant, le DMF est ajouté au milieu réactionnel (5 %). Des essais ont été réalisés en présence de l'aldéhyde **29** (*R*) obtenu soit avec le TBAF soit avec le mélange HCl/THF. Après 24 heures de réaction, l'ajout d'acide n'est plus nécessaire et la concentration en HPA déterminée par le dosage spectrophotométrique n'évolue plus malgré l'introduction de TK. Dans le cas de l'aldéhyde (*R*)-**29** obtenu par déprotection en conditions acides, le taux de conversion du HPA (compte tenu du témoin réalisé en l'absence de TK) est de 64 % (Figure 114). Après une purification par chromatographie sur gel de silice (cyclohexane / acétate d'éthyle 4 / 6), le composé **3** est obtenu sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 25 % (par rapport au composé (*R*)-**28**).



(■ : milieu réactionnel sans TK ; ● : réaction)

Figure 114 : Suivi de la concentration en HPA au cours de la synthèse du composé **3** catalysée par la TK

Dans le cas de l'aldéhyde (*R*)-**29** obtenu par déprotection au TBAF, une conversion totale de l'aldéhyde (*R*)-**29** a été observée uniquement par CCM (le taux de conversion par rapport aux HPA n'a pas été estimé). Après une purification par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane / méthanol 95 / 5), le composé **3** est obtenu sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 33 % par rapport au composé (*R*)-**28**.

Dans chacun des cas, l'analyse du spectre RMN  $^1\text{H}$  indique la présence de deux doublets à 4,44 et 4,54 ppm avec une constante de couplage de 19,2 Hz caractéristique du  $\text{CH}_2$  en  $\alpha$  du groupement carbonyle. De plus, l'analyse du spectre RMN  $^{13}\text{C}$  indique la présence d'un groupement carbonyle à 213,9 ppm.

#### 1.4.1.3. Conclusion

La formation du composé **3** à l'issue de la réaction enzymatique confirme la présence de l'aldéhyde (*R*)-**29** en tant que substrat accepteur de la TK. Le composé **3** a donc été préparé en six étapes à partir de la D-leucine avec un rendement global satisfaisant de 12 % à partir de l'aldéhyde (*R*)-**29** obtenu en conditions acides et 16 % à partir de l'aldéhyde (*R*)-**29** obtenu en présence de TBAF. Les méthodes de déprotection testées conduisent donc à des rendements similaires. L'aldéhyde (*R*)-**29** étant un substrat accepteur de la TK, selon la réaction inverse, le produit de cette réaction, le cétose D-*thréo* **3** peut donc être envisagé comme substrat donneur de la TK dans le cadre du test de sélection. De plus, la stratégie de synthèse de l'aldéhyde nous a également permis d'obtenir, à partir de la L-leucine, l'énantiomère (*S*)-**29** qui nous sera utile pour la mise au point du test de sélection.

### 1.4.2. Synthèse du composé **3** catalysées par les aldolases

Le substrat accepteur des deux aldolases (FDPA et FSA) est l'isovaléraldéhyde, composé commercial (Figure 115).

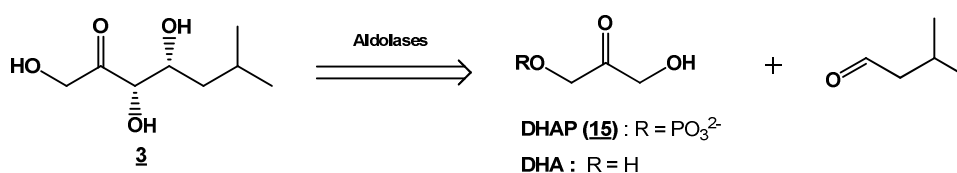
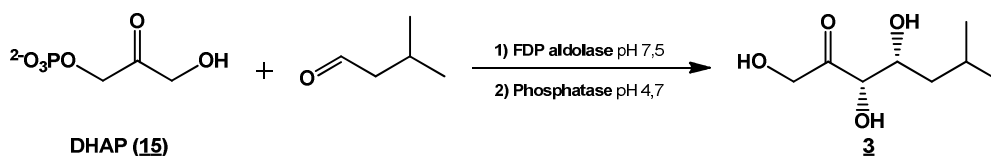


Figure 115 : Rétrosynthèse du composé **3**

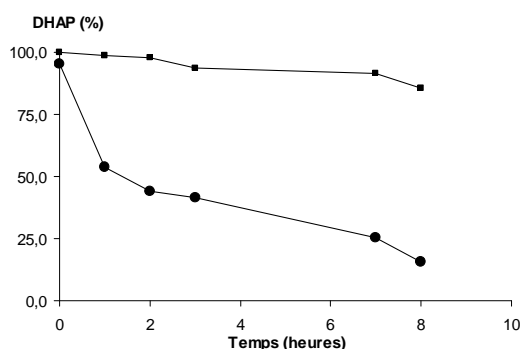
#### 1.4.2.1. Synthèse catalysée par la FDP aldolase

Pour accéder au composé **3**, la FDPA a été utilisée pour condenser le DHAP **15** sur l'isovaléraldéhyde. L'hydrolyse du groupement phosphate est catalysée par la phosphatase acide (Figure 116).



**Figure 116 : Synthèse du composé **3** en présence de FDPA**

L'isovaléraldéhyde n'étant pas totalement soluble en milieu aqueux, un cosolvant, le DMF (20 %), a été introduit dans le milieu réactionnel.



(■ : milieu réactionnel sans FDPA ; ● : réaction)

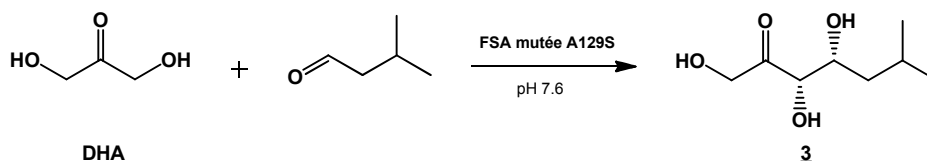
**Figure 117 : Suivi de la concentration en DHAP au cours de la synthèse du composé **3** catalysée par la FDP aldolase**

Le suivi de la concentration en DHAP au cours de la réaction indique qu'après 8 heures de réaction, la concentration de la DHAP n'évolue pratiquement plus. Finalement, le taux de conversion de la DHAP (en tenant compte du témoin réalisé sans FDPA) est de 70 % (Figure 117). La déphosphorylation du produit de la réaction (non isolé) en présence de phosphatase acide est complète après 24 heures de réaction. Après purification par chromatographie sur gel de silice éclair (cyclohexane / acétate d'éthyle 1 / 1), le composé **3** est obtenu sous forme d'un solide déliquescent avec un rendement de 31 %.

Le produit est identifié par l'analyse des spectres RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  identiques à ceux obtenus dans le cas de la réaction catalysée par la TK.

#### 1.4.2.2. Synthèse catalysée par la FSA

Pour accéder au composé **3**, la condensation du DHA sur l'isovaléraldéhyde a été réalisée en présence de la FSA (A129S) (Figure 118).



**Figure 118 : Réaction catalysée par la FSA en présence de l'isovaléraldéhyde**

Aucun cosolvant n'est utilisé, la FSA étant active en milieu biphasique lorsque le substrat n'est pas soluble. Après 24 heures de réaction, la DHA est totalement consommée comme l'indique le suivi par CCM. Après purification par chromatographie sur gel de silice éclair (gradient dichlorométhane/ méthanol), le composé **3** est obtenu sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 77 %. Le produit est identifié par l'analyse des spectres RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  qui sont identiques à ceux obtenus en présence de l'isovaléraldéhyde et de la FDPA.

### 1.4.3. Conclusion

Le composé **3** a été obtenu selon trois voies enzymatiques distinctes. La condensation de la DHA sur l'isovaléraldéhyde catalysée par la FSA mutée s'est révélée la voie la plus efficace (rendement = 77 %) et la plus rapide (une seule étape). Les deux autres voies ont conduit à des rendements beaucoup plus modestes (TK : 16 % et FDP aldolase : 31 %) avec un nombre d'étapes plus important.

## 1.5. Synthèse chimioenzymatique du composé **4**

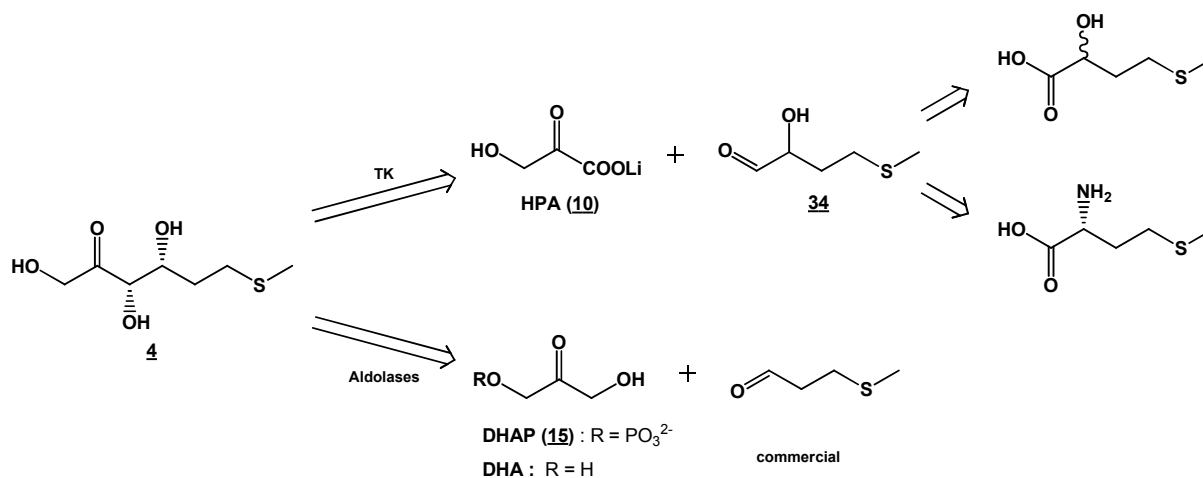


Figure 119 : Rétrosynthèse du composé **4**

La synthèse du composé **4** catalysée par la TK nécessite l'utilisation de l'aldéhyde  $\alpha$ -hydroxylé **34** (de configuration *R* ou sous forme racémique). La voie reposant sur l'utilisation d'aldolases nécessite le méthional comme substrat accepteur (Figure 119).

### 1.5.1. Synthèse du composé **4** catalysée par la TK

#### 1.5.1.1. Synthèse du substrat accepteur

La synthèse du composé **34** a été développée à partir des acides aminés correspondants (Figure 120), d'une part sous forme optiquement pure à partir de la méthionine D et L et d'autre part sous forme racémique à partir de l'acide  $\alpha$ -hydroxylé racémique correspondant, l'acide 2-hydroxy-4-(méthylthio)butyrique **30** qui est commercial. Nous avons réalisé la synthèse des deux énantiomères (*R*) et (*S*) de l'aldéhyde **34** car ils seront nécessaires pour la mise au point du test de sélection. L'énantiomère *R* et le mélange racémique seront utilisés comme substrat de la TK pour accéder au composé **4**.

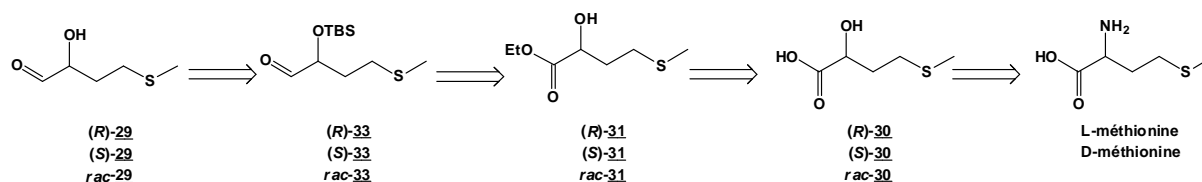


Figure 120 : Rétrosynthèse de l'aldéhyde **34**

#### ➤ Désamination nitreuse de la D-méthionine D et de la L-méthionine :

Les composés (*R*)-**30** et (*S*)-**30** ont été préparés par désamination nitreuse à partir de la D-méthionine et de la L-méthionine respectivement.

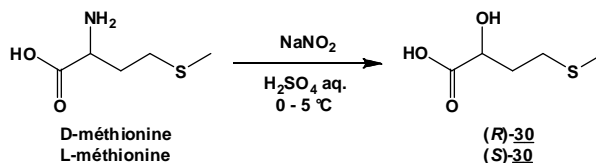
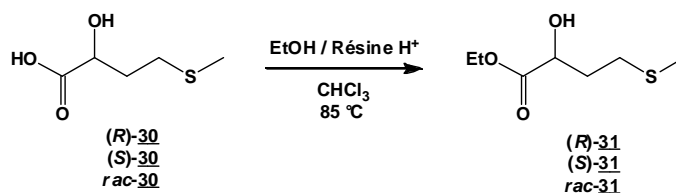


Figure 121 : Désamination nitreuse de la méthionine

Après addition lente de la solution de nitrite de sodium à 0 °C, la réaction est laissée à température ambiante pendant une nuit. La fin de la réaction est confirmée par la disparition complète de la méthionine en CCM (isopropanol / H<sub>2</sub>O 7/3). Après extraction à l'éther, les acides  $\alpha$ -hydroxylés (*R*)-**30** et (*S*)-**30** sont obtenus sous forme d'une huile orange que nous n'avons pas réussi à purifier par la méthode habituelle (lavage au pentane) ou par recristallisation. La présence du proton de l'atome de carbone portant le groupement hydroxyle est confirmée par l'analyse des spectres RMN <sup>1</sup>H (disparition du proton de la fonction amine à 3,65 ppm et apparition du proton de l'hydroxyle à 3,4 ppm). En raison des difficultés de purification, les composés (*R*)-**30** et (*S*)-**30** sont engagés directement dans l'étape suivante. Le rendement de la désamination nitreuse sera donc estimé après purification des esters obtenus à l'issue de l'étape suivante (composés (*R*)-**31** et (*S*)-**31**)

#### ➤ Estérification de la fonction acide carboxylique du composé **30** :

L'estérification est réalisée selon le protocole décrit par Effenberger<sup>140</sup> d'une part, à partir de composé **30** racémique commercial et d'autre part, à partir des composés (*R*)-**30** et (*S*)-**30** obtenus lors de l'étape précédente.



**Figure 122 : Estérification de la fonction acide carboxylique du composé **30****

La réaction est réalisée en présence de résine acide dans un mélange d'éthanol absolu et de chloroforme (Figure 122) selon la méthode décrite précédemment. Le milieu réactionnel est laissé à reflux pendant 24 heures. Après filtration de la résine et évaporation des solvants sous pression réduite, le composé **31** racémique (*rac*-**31**) est obtenu sous forme d'un liquide translucide brunâtre avec un rendement de 98 %. Les composés (*R*)-**31** et (*S*)-**31** nécessitent une purification sur gel de silice éclair et sont obtenus sous forme d'un liquide incolore avec un rendement global pour les étapes de désamination et d'estérification de 7 et 21 % respectivement. L'estérification du groupement carboxyle est confirmée par l'analyse des spectres <sup>1</sup>H RMN (présence d'un triplet à 1,25 ppm et d'un multiplet à 4,2 ppm correspondant au groupement éthyle de l'ester) et <sup>13</sup>C RMN (présence de deux carbones à 14,3 ppm et 61,8 ppm correspondant au groupement éthyle de l'ester). Les pouvoirs rotatoires des composés (*R*)-**31** et (*S*)-**31** sont respectivement de + 6,9° et – 7,1°.

En conclusion, les rendements de la réaction d'estérification peuvent être considérés comme quantitatifs (en se basant sur le rendement d'estérification obtenu pour le composé *rac*-**31**). Par conséquent, le faible rendement global des deux étapes (désamination et estérification) pour les composés (*R*)-**31** et (*S*)-**31** peuvent être attribués à l'étape de désamination. Nous avons envisagé différentes conditions réactionnelles (variation de la concentration et du nombre d'équivalents) sans obtenir de meilleurs rendements. Il est à noter que les rendements cités dans la littérature<sup>141-142</sup> pour la désamination nitreuse de la méthionine sont également faibles et varient de 14 à 17 %. Il est probable que la réaction soit perturbée par la présence de l'atome de soufre. Dans ce cas l'entité N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> réagirait avec l'atome de soufre et non l'azote pouvant ainsi conduire à une série de produits secondaires (Figure 96).

➤ Protection de la fonction hydroxyle du composé **31**

Le groupement hydroxyle du composé **31** a été protégé par un éther de silyle.

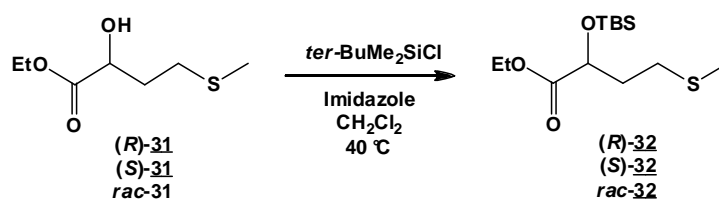


Figure 123 : Protection de la fonction hydroxyle du composé **32**

La réaction a été effectuée dans le dichlorométhane anhydre en présence d'imidazole et de chlorure de *ter*-butyldiméthylsilyle (Figure 123). Après l'addition des réactifs à température ambiante, la réaction est laissée à reflux du dichlorométhane pendant une nuit. Après purification sur gel de silice éclair, les composés *rac*-**32**, (*R*)-**32** et (*S*)-**32** sont obtenus sous forme d'un liquide incolore avec un rendement de 90 %, 73 % et 82 % respectivement. L'analyse du spectre RMN  $^1\text{H}$  montre la présence de trois singulets à 0,06 ; 0,08 et 0,89 ppm correspondant respectivement aux deux groupements méthyles et au groupement *ter*-butyle portés par l'atome de silicium. L'analyse du spectre RMN  $^{13}\text{C}$  indique des déplacements caractéristiques des substituants de l'atome de silicium à – 5 et – 4,6 ppm correspondant aux deux groupements méthyles et à 18,3 et 25,7 ppm correspondant au groupement *ter*-butyle. Les puretés énantiomériques des composés (*R*)-**32** et (*S*)-**32** sont estimées par la comparaison de leurs pouvoirs rotatoires qui sont respectivement de + 40,7° et – 40°.

➤ Réduction partielle de la fonction ester du composé **32**

La réduction partielle de la fonction ester en fonction aldéhyde a été réalisée par l'hydrure de diisobutylaluminium lithium à – 78 °C dans le dichlorométhane (Figure 124).

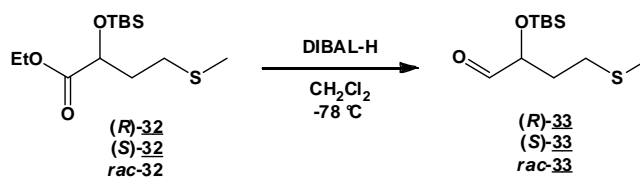


Figure 124 : Réduction partielle de la fonction ester du composé **32**

Après une addition lente de l'hydrure de diisobutylaluminium lithium, la réaction est maintenue à – 78 °C pendant une nuit. Après purification sur gel de silice éclair, les composés *rac*-**33**, (*R*)-**33** et (*S*)-**33** sont obtenus sous la forme d'un liquide incolore avec des rendements respectifs de 78 %, 82 % et 80 %. La réduction de la fonction ester en fonction aldéhyde est confirmée par l'analyse des spectres  $^1\text{H}$  RMN (proton aldéhydique à 9,59 ppm et disparition du  $\text{CH}_3$  à 1,27 et du  $\text{CH}_2$  à 4,18 ppm de la fonction ester) et  $^{13}\text{C}$  RMN (apparition d'un



carbonyle à 203,3 ppm et disparition du carbonyle de l'ester à 173,5 ppm). Les pouvoirs rotatoires des composés (*R*)-**33** et (*S*)-**33** sont respectivement de + 28,8° et – 28,2°.

### ➤ Déprotection de la fonction hydroxyle du composé **33**

Cette étape a été réalisée en présence de fluorure (acide hydrofluorique ou fluorure de tétrabutylammonium) et en conditions acides (Figure 125).

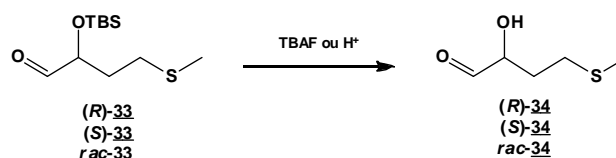


Figure 125 : Déprotection de la fonction hydroxyle du composé **33**

■ Déprotection en présence de fluorure de tétrabutylammonium : Cette réaction a été réalisée dans le tétrahydrofurane en présence de fluorure de tétrabutylammonium (TBAF) à 0 °C et a conduit à la formation d'un nouveau composé ainsi que de nombreux sous-produits qu'il nous été impossible de séparer par chromatographie sur gel de silice. Cette stratégie de déprotection a donc été abandonnée.

■ Déprotection en conditions acides : La déprotection de l'éther silylé en conditions acides a été réalisée en présence de résine Dowex H<sup>+</sup> dans l'eau à 30 °C pendant une nuit. La réaction a été suivie par CCM et montre la disparition des composés **33** (*rac*, (*R*) et (*S*)) et l'apparition dans chacun des cas d'un seul produit majoritaire. Après élimination de la résine par filtration, les solutions aqueuses obtenues à partir des composés **33** (*rac*, (*R*)) sont engagées dans la réaction catalysée par la TK qui nous confirmera la présence du produit de couplage attendu.

### ➤ Conclusion

La stratégie développée nous a conduit aux aldéhydes α-hydroxylés protégés (*R*)-**33** et (*S*)-**33** en quatre étapes avec un rendement global de 5 % et 13 % respectivement. L'étape critique s'est révélée être la désamination nitreuse de la méthionine D et L (7 % et 21 %). La synthèse de l'aldéhyde α-hydroxylé protégé *rac*-**33** a été réalisée à partir de l'acide α-hydroxylé *rac*-**30** correspondant en trois étapes avec un rendement global de 64 %.

#### 1.5.1.2. Réaction catalysée par la TK

Pour accéder au composé **4**, le transfert du groupement hydroxyacétyle du HPA sur le composé **31** (*R* ou racémique) est catalysé par la TK (Figure 126).

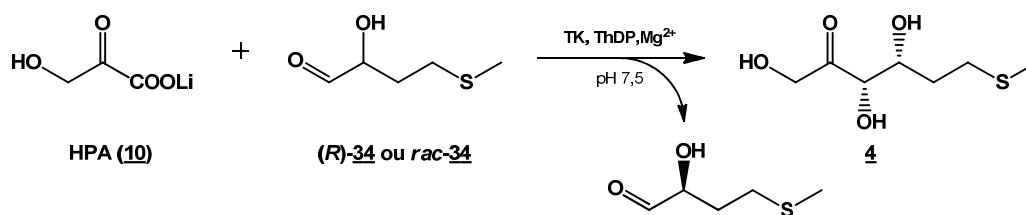
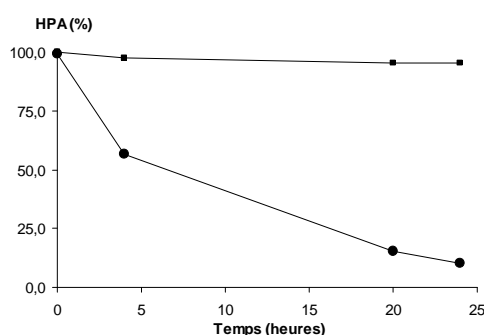


Figure 126 : Synthèse du composé **4** catalysée par la TK

La réaction est réalisée selon les conditions standards définies précédemment. Après 24 heures de réaction, l'ajout d'acide n'est plus nécessaire et la concentration en HPA déterminée par le dosage spectrophotométrique n'évolue plus malgré l'introduction de TK (Figure 124).



(■ : milieu réactionnel sans TK ; ● : réaction)

Figure 127 : Suivi de la concentration en HPA au cours de la synthèse du composé **4** catalysée par la TK

Les taux de conversion du HPA (compte tenu du témoin réalisé en l'absence de TK) sont de l'ordre de 85 % (Figure 127). Après une purification par chromatographie sur gel de silice (gradient cyclohexane/acétate d'éthyle) suivie d'une cristallisation, le composé **4** est obtenu sous forme d'un solide blanc avec des rendements allant de 23 % (quant la synthèse est réalisée à partir du composé **34-rac**) à 35 %.

L'analyse du spectre RMN  $^1\text{H}$  indique la présence de deux doublets à 4,43 et 4,53 ppm avec une constante de couplage de 19,2 Hz caractéristique du  $\text{CH}_2$  en  $\alpha$  du groupement carbonyle. De plus, l'analyse du spectre RMN  $^{13}\text{C}$  indique la présence d'un groupement carbonyle à 213,5 ppm.

#### 1.5.1.3. Conclusion

Cette voie chimioenzymatique catalysée par la TK a permis d'obtenir le composé **4** soit à partir de la *D*-méthionine en 6 étapes soit à partir de l'acide  $\alpha$ -hydroxylé *rac*-**30** correspondant en 5 étapes, avec des rendements globaux respectifs de 2 % et 31 %. L'étape

limitante dans le cas de la *D*-méthionine est la désamination nitreuse ce qui est également décrit dans la littérature.

La synthèse du composé **4** catalysée par la TK montre que l'aldéhyde (*R*)-**34** est un substrat accepteur de cette enzyme. Selon la réaction inverse, le cétose *D*-thréo **4** pourrait donc se comporter comme un substrat donneur de la TK dans le cadre du test de sélection.

Enfin, la stratégie de synthèse développée pour accéder à l'aldéhyde **34** nous a également permis d'obtenir l'énantiomère (*S*) qui nous sera utile pour la mise au point du test de sélection.

### 1.5.2. Synthèse du composé **4** catalysée par les aldolases

Nous avons commencé cette étude avec la FSA car compte-tenu des résultats obtenus précédemment, la FSA est la plus efficace des deux aldolases testées. La FSA (A129S) a été envisagée en présence de méthional composé commercial et du DHA comme substrat donneur (Figure 128).

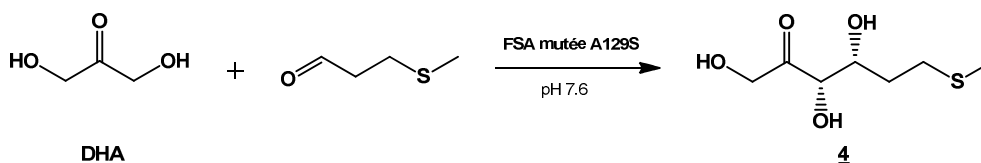


Figure 128 : Synthèse du composé **4** catalysée par les aldolases

Le méthional n'est pas soluble en milieux aqueux. L'ajout de DMF, de DMSO, d'éthanol ou de THF jusqu'à une teneur de 30 % (teneur maximale compatible avec l'activité de l'enzyme) n'ayant donné aucun résultat, un traitement en milieu acide à chaud (pH 1 à reflux pendant deux heures) a permis d'obtenir sa solubilisation. Après refroidissement à température ambiante et ajustement du pH à 7,5, la solution est directement mise en réaction avec la FSA.

Après 24 heures de réaction, la DHA est totalement consommée comme l'indique le suivi par CCM. Après purification par chromatographie sur gel de silice éclair (gradient dichlorométhane / méthanol), le composé **4** est obtenu sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 67 %. Le produit est identifié par l'analyse des spectres RMN <sup>1</sup>H et RMN <sup>13</sup>C qui sont identiques à ceux obtenus avec la TK.

### 1.5.3. Conclusion

Le composé **4** a été obtenu selon deux voies enzymatiques distinctes. La condensation de la DHA sur l'isovaléraldéhyde catalysée par la FSA mutée s'est révélée la voie la plus efficace (rendement = 67%) et la plus rapide (une seule étape). Compte-tenu des bons

rendements obtenus la réaction n'a pas été envisagée avec la FDA. La voie impliquant la TK a conduit à des rendements plus modestes avec un nombre d'étapes plus important.

## 1.6. Synthèse chimioenzymatique du composé 5

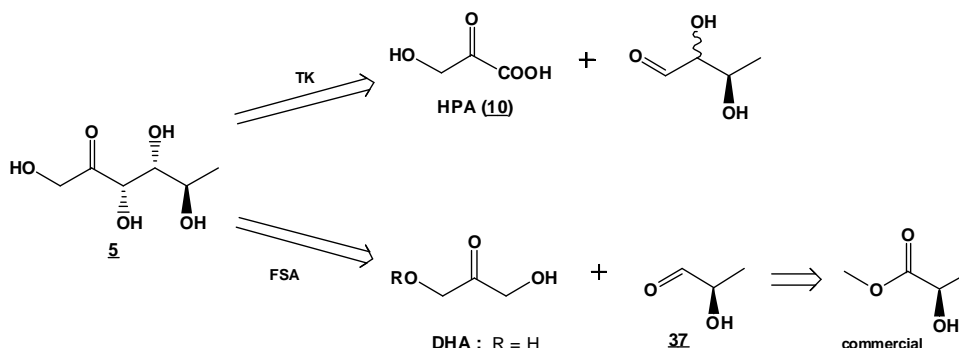


Figure 129 : Rétrosynthèse du composé 5

La synthèse du composé 5 catalysée par la TK nécessiterait le dihydroxybutyraldéhyde (3R) comme substrat accepteur. La synthèse de cet aldéhyde étant délicate, nous avons envisagé dans un premier temps de réaliser la synthèse du composé 5 avec la FSA qui a conduit aux meilleurs rendements précédemment. Le D-lactaldéhyde 37, aldéhyde  $\alpha$ -hydroxylé non commercial, est le substrat accepteur approprié pour accéder au composé 5 (Figure 129).

### 1.6.1. Synthèse du composé 5 catalysée par la FSA

#### 1.6.1.1. Synthèse du substrat accepteur

La synthèse du D-lactaldéhyde 37 a été envisagée selon une voie décrite dans la littérature<sup>143</sup>, en trois étapes à partir du D-lactate de méthyle. Cette stratégie consiste à générer la fonction aldéhyde à partir de la fonction ester en ayant protégé au préalable le groupement hydroxyle sous forme d'éther silylé (Figure 130).

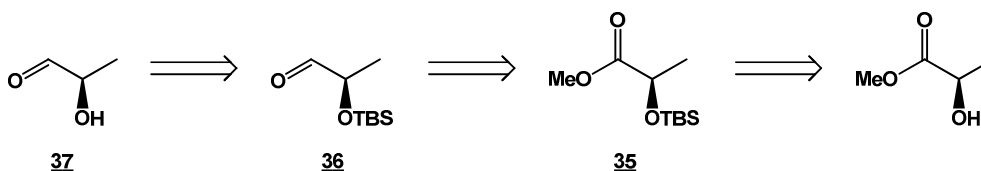


Figure 130 : Rétrosynthèse de l'aldéhyde 37

#### ➤ *Protection de la fonction hydroxyle*

La réaction a été effectuée dans le dichlorométhane anhydre en présence d'imidazole et de chlorure de *ter*-butyldiméthylsilyle (Figure 131).

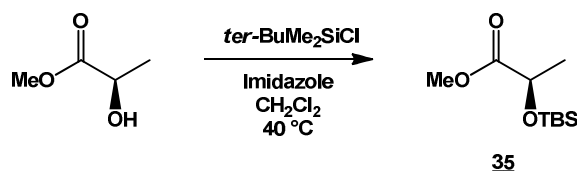


Figure 131 : Synthèse du composé **35**

Après l'addition des réactifs à température ambiante, la réaction est laissée à reflux du dichlorométhane pendant une nuit. Après purification sur gel de silice éclair, le composé **35** est obtenu sous forme d'un liquide incolore avec un rendement de 90 %. L'analyse du spectre RMN  $^1\text{H}$  montre la présence de trois singulets à 0,06 ; 0,08 et 0,89 ppm correspondant respectivement aux deux groupements méthyles et au groupement *ter*-butyle portés par l'atome de silicium. L'analyse du spectre RMN  $^{13}\text{C}$  indique des déplacements caractéristiques des substituants de l'atome de silicium à  $-5$  et  $-4,6$  ppm correspondant aux deux groupements méthyles et à 18,3 et 25,7 ppm correspondant au groupement *ter*-butyle portés par l'atome de silicium. L'analyse du spectre RMN  $^1\text{H}$  est conforme à celui décrit dans la littérature<sup>144</sup>.

➤ Réduction partielle de la fonction ester du composé **35**

La réduction partielle de la fonction ester en fonction aldéhyde a été réalisée par l'hydruire de diisobutylaluminium lithium à  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  dans le dichlorométhane (Figure 132).

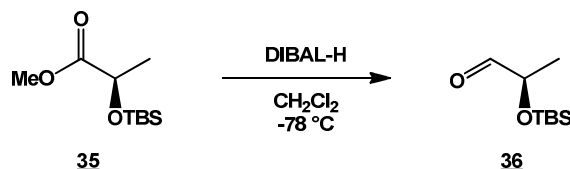
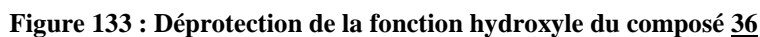


Figure 132: Réduction partielle de la fonction ester du composé **35**

Après une addition lente de l'hydruire de diisobutylaluminium lithium, la réaction est maintenue à  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  pendant deux heures. Après purification sur gel de silice éclair, le composé **36** est obtenu sous la forme d'un liquide incolore avec un rendement de 70 %. La réduction de la fonction ester en fonction aldéhyde est confirmée par l'analyse des spectres  $^1\text{H}$  RMN (proton aldéhydique à 9,61 ppm et disparition du groupement  $\text{CH}_3$  à 1,27 et du groupement  $\text{CH}_2$  à 4,18 ppm de l'ester).

➤ Déprotection de la fonction hydroxyle du composé **36**

1.  $\frac{1}{2}$  2.  $\frac{1}{2}$  3.  $\frac{1}{2}$  4.  $\frac{1}{2}$  5.  $\frac{1}{2}$  6.  $\frac{1}{2}$  7.  $\frac{1}{2}$  8.  $\frac{1}{2}$  9.  $\frac{1}{2}$  10.  $\frac{1}{2}$



---

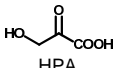

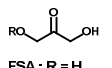

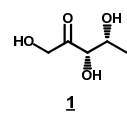


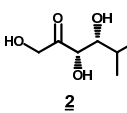


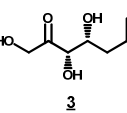


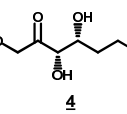


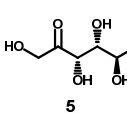


### 1.6.1.3. Conclusion

Le composé **5** a été obtenu avec la FSA en 4 étapes avec un rendement global de 35 % à partir du D-lactate de méthyle. Il est à noter que parmi les sondes cétose *D-thréo* synthétisées, le composé **5** est le seul à être présent sous forme cyclique, les tests enzymatiques en présence de la TK nous montreront si le composé **5** est un substrat donneur de la TK. La synthèse du composé **5** n'a pas été envisagée avec la TK pour des raisons d'accessibilité de l'aldéhyde accepteur requis.

## 1.7. Bilan des synthèses des composés cétose *D-thréo*

Les sondes **1** à **5** présentant le motif cétose *D-thréo* ont été obtenues (Tableau 22) par formation d'une liaison C-C catalysée par les trois enzymes envisagées (TK, FDPA et FSA). Les sondes **3** et **4** n'ont pas été décrites dans la littérature. Seul le cétose **2** n'a pu être synthétisé à l'échelle préparative. De faibles vitesses initiales en présence de la FDPA avait déjà été mentionnée dans la littérature<sup>145</sup>. Ce composé ne sera donc pas testé en tant que substrat donneur de la TK.

Transcétolase				Aldolases				Produits
Substrat donneur	Substrat accepteur	Rendement		Substrat donneur	Substrat accepteur	Rendement		
		Etape enzymatique	Global			FDPA	FSA	
 HPA	 <b>17</b>	31 %	23 %	 FSA : R = H FDPA : R = PO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	 <b>1</b>	14 %	71 %	 <b>1</b>
	 <b>24</b>	5 %	2 %		 <b>2</b>	NR	NR	 <b>2</b>
	 <b>29</b>	48 %	16 %		 <b>3</b>	31 %	77 %	 <b>3</b>
	 <b>34</b>	48 %	31 %		 <b>4</b>	NE	67 %	 <b>4</b>
	 <b>37</b>	NE	NE		 <b>37</b>	NE	55 %	 <b>5</b>

(NR : pas de réaction ; NE : non effectué)

Tableau 22 : Tableau récapitulatif des voies de synthèses des sondes cétores *D-thréo* **1** à **5**

▪ La voie chimioenzymatique impliquant la TK nécessite des aldéhydes  $\alpha$ -hydroxylés en tant que substrat accepteurs qui ont été synthétisés selon une approche commune à partir des acides aminés ou des hydroxyacides correspondants sous forme racémique et/ou énantiopurs (Figure 135). Les rendements obtenus sont dans l'ensemble satisfaisants (Tableau 22). Certains aldéhydes optiquement purs (**25**, **26**) seront également utilisés *in vivo* pour l'étude du test de sélection.

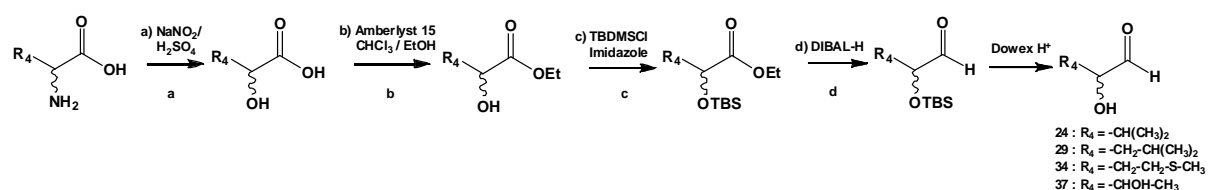


Figure 135 : Stratégie utilisée pour accéder aux aldéhydes  $\alpha$ -hydroxylés

Etape de synthèse		a		b		c		d	
Valine	$R_4 = -CH(CH_3)_2$	<b>20</b>	52 %	<b>21</b>	95 %	<b>22</b>	84 %	<b>23</b>	90 %
Leucine	$R_4 = -CH_2-CH(CH_3)_2$	<b>26</b>	62 à 81 %	<b>28</b>	90 à 97 %	<b>27</b>	81 à 90 %	<b>28</b>	80 à 90 %
Méthionine	$R_4 = -CH_2-CH_2-S-CH_3$	<b>30</b>	7 à 21 %	<b>31</b>	98 %	<b>32</b>	73 à 90%	<b>33</b>	78 à 82 %
Thréonine	$R_4 = -CHOH-CH_3$		-		-	<b>36</b>	90 %	<b>38</b>	70 %

Tableau 23 : Rendements des différentes étapes de synthèse des aldéhydes  $\alpha$ -hydroxylés

A l'issu des réactions catalysées par la TK, l'aldéhyde comportant un groupement isopropyle (**24**) conduit au cétose **2** correspondant avec un très faible rendement en raison sans doute de l'encombrement stérique proche de la fonction aldéhyde. Les aldéhydes présentant un groupement méthyle (**17**) ou isobutyle (**29**) (l'encombrement stérique est plus éloigné de la fonction aldéhyde par rapport à l'aldéhyde **24**) ou encore un hétéroatome tel que le soufre (**34**) conduisent aux cétoles correspondants avec des rendements assez proches.

Les cétoles D-thréo obtenus **1**, **3** et **4** pourraient donc se comporter comme des substrats donneurs de la TK selon la réaction inverse. Le composé **5** n'a pas été préparé avec la TK (la synthèse du 3R-dihydroxybutyraldéhyde étant délicate) mais avec la FSA. Il sera testé *in vitro* en tant que substrat donneur de la TK dans le chapitre suivant.

▪ Les voies chimioenzymatiques impliquant les aldolases conduisent aux produits souhaités avec des rendements satisfaisants notamment dans le cas de la FSA, enzyme produite et utilisée récemment au laboratoire. Cette enzyme qui n'avait pas été proposée en synthèse jusqu'alors se montre donc très tolérante vis-à-vis des aldéhydes testés sauf dans le cas de l'aldéhyde **24** comportant un groupement isopropyle certainement pour les raisons 'encombrement stérique évoquées ci-dessus. Cette stratégie rapide et efficace peut donc être employée pour obtenir en quantité suffisante les cétoles **1**, **3**, **4** et **5**.



## 2. Synthèse des sondes présentant le motif cétose *L-érythro*

L'objectif est d'utiliser les sondes cétose *L-érythro* pour sélectionner des TK mutées qui seront capables de reconnaître le carbone 4 (*S*) dont la configuration est inversée par rapport au motif reconnu par la TK sauvage qui est (*R*).

Les sondes cétose *L-érythro* portent les chaînes latérales de la leucine et de la méthionine. En effet, nous verrons dans la partie consacrée à la mise au point du test de sélection en présence de la TK sauvage que les cétooses-*D-thréo* précurseurs de leucine et de la méthionine seront privilégiés.

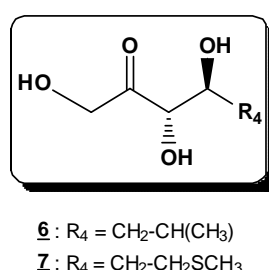


Figure 136 : Sondes cétose-*L-érythro*

Le motif glycosylé cétose *L-érythro* (3*S*, 4*S*) est accessible par voie enzymatique en utilisant la tagatose 1,6 biphosphate aldolase (TDP aldolase), une DHAP aldolase catalysant la formation stéréospécifique de liaison C-C. Malheureusement, cette enzyme n'est pas stéréospécifique et conduit à la formation d'un mélange de cétooses *L-érythro* et *D-thréo*. Pour accéder aux cétooses *L-érythro* **6** et **7**, nous avons choisi d'utiliser une autre stratégie de synthèse faisant appel à l'organocatalyse en présence de L-proline.

### 2.1. Aldolisation asymétrique par voie chimique : l'organocatalyse

La DHA (protégée sous forme d'acétonide) utilisée comme substrat donneur en présence d'un accepteur aldéhydique et de L-proline en tant que catalyseur conduit à des cétooses *L-érythro* (3*S*, 4*S*). Cette approche mime ainsi la réaction catalysée par la tagatose-1,6-diphosphate aldolase<sup>146-147-148</sup> (Figure 137).

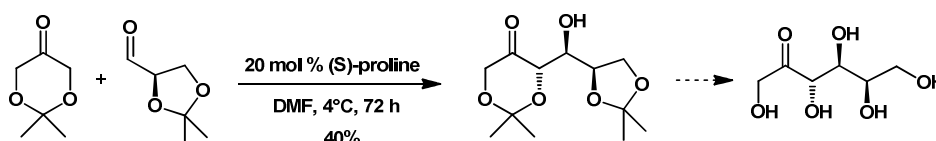
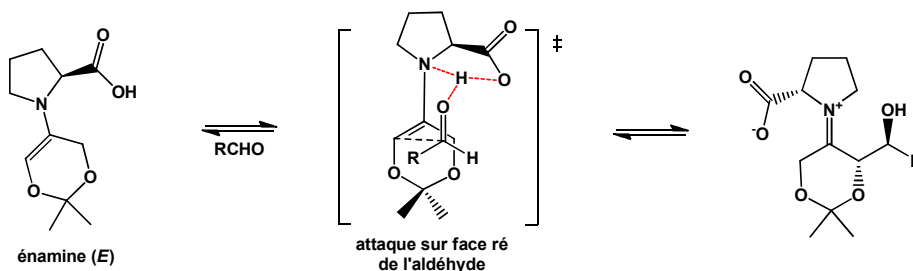


Figure 137 : Réaction d'aldolisation asymétrique catalysée par la L-proline mimant la TDP aldolase.

Le mécanisme de la réaction d'aldolisation en présence de L-proline peut être assimilé à une « micro-aldolase » (Figure 138). En effet, l'attaque nucléophile de l'amine et la catalyse acide due à la fonction acide carboxylique de la L-proline vont permettre de former l'énamine de configuration (*E*) (en raison de la rigidité des deux cycles et de l'encombrement stérique). L'attaque de l'énamine (*E*) se fait sur la face *Ré* de l'aldéhyde. La sélectivité énantiofaciale de l'attaque est due à l'encombrement et également à la liaison hydrogène qui se crée entre les trois hétéroatomes et l'hydrogène de la fonction acide carboxylique<sup>149</sup>

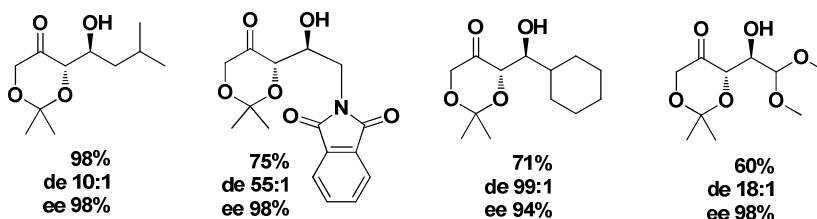


**Figure 138 : Mécanisme proposé pour la réaction d'aldolisation asymétrique directe catalysée par la L-proline**

Il est à noter que l'utilisation de la D-proline permet d'accéder à des cétooses de configuration *D-érythro* (*3R*, *4R*), mimant ainsi la fucose-1-phosphate aldolase<sup>146</sup>.

La DHA protégée sous forme d'acétonide, utilisée comme substrat donneur, n'est pas commerciale. Cependant sa synthèse<sup>150</sup> est moins délicate que la DHAP utilisée comme substrat donneur des DHAP aldolases. De plus, si le substrat aldéhydique possède des groupes hydroxyles, ils doivent être également protégés. Au final, le produit de la réaction doit donc être déprotégé si la présence de groupements hydroxyles libres est requise.

De nombreux analogues de cétohexoses ont pu être synthétisés à partir de la DHA et de différents aldéhydes accepteurs<sup>146</sup>. Il est à noter que cette stratégie n'est décrite à ce jour dans la littérature qu'en présence d'aldéhydes accepteurs présentant des groupements *R* hydrophobes.



**Figure 139 : Quelques exemples d'analogues de cétooses obtenus par organocatalyse**

Enfin, même si les réactions tendent à se développer dans l'eau<sup>151</sup>, le DMF ou le DMSO comme solvants conduisent dans la plupart des cas à de meilleurs ee/de et à des temps de réaction plus courts.

### 2.1.1. Synthèse de la DHA protégée **39**

La préparation de la 2,2-diméthyl-1,3-dioxan-5-one **39** (DHA protégée sous la forme d'acétonide) est réalisée en deux étapes à partir du chlorhydrate de Trizma<sup>®</sup> (Figure 140) selon la méthode proposée par Enders et al.<sup>150</sup>, qui consiste à synthétiser le composé **39**, sans purification préalable du composé **38**.

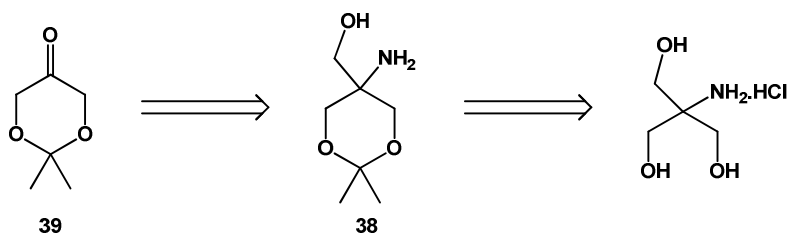


Figure 140 : Synthèse de la DHA protégée **39**

#### 2.1.1.1. Protection du Trizma<sup>®</sup> sous forme d'acétonide

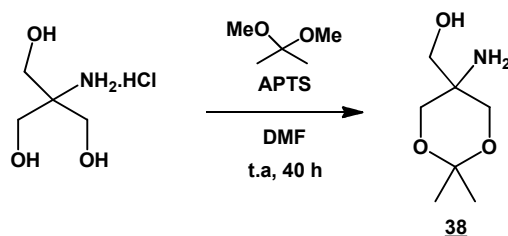


Figure 141 : Synthèse du composé **38**

Cette réaction est une transacétalisation réalisée en présence de 2,2-diméthoxypropane (2,2-DMP) et d'acide *p*-toluènesulfonique comme catalyseur (Figure 141). Après neutralisation du milieu réactionnel par ajout de triéthylamine, suivie d'une distillation du DMF, le composé **38** est obtenu sans purification sous la forme d'un solide jaunâtre. Le produit est identifié par l'analyse des spectres RMN <sup>1</sup>H (présence de deux singulets à 1,40 et 1,43 ppm correspondants aux méthyles de l'acétonide) et RMN <sup>13</sup>C (présence d'un pic à 98,4 pm correspondant au carbone quaternaire de l'acétonide).

#### 2.1.1.2. Coupure oxydante du composé **38**

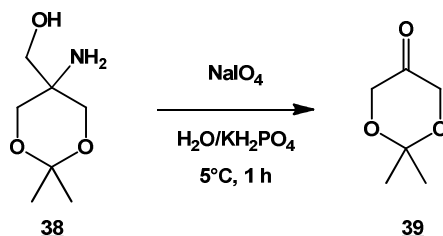


Figure 142 : Coupure oxydante du composé **38**

La DHA protégée **39** est obtenue par une réaction de coupure oxydante en présence de périodate de sodium (NaIO<sub>4</sub>). Après purification sur gel de silice éclair, le composé **39** est

obtenu sous la forme d'un liquide transparent avec un rendement global de 60 %. L'analyse des spectres  $^1\text{H}$  (disparition du singulet élargi à 2,84 ppm correspondant aux protons de l'alcool libre et de l'amine) et  $^{13}\text{C}$  (présence d'un pic à 207,9 ppm correspondant au groupe carbonyle) permet de confirmer la présence du composé **39**. Ce composé étant volatile et instable<sup>152</sup> (même stocké à  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  sous atmosphère inerte), il sera donc utilisé directement après purification. Il est à noter que le composé **39** conduit spontanément au composé **40** dimère de **39** que nous avons identifié par RMN du  $^1\text{H}$ . La formation de ce sous produit est déjà décrite dans la littérature<sup>152</sup>.

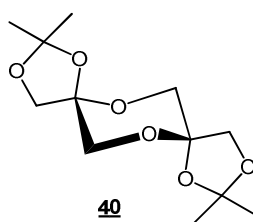


Figure 143 : Dimère **40** issu de la décomposition du composé **39**

## 2.2. Synthèse du composé **6**

La synthèse du composé **6** a été préparée à partir de son analogue protégé **41** obtenu par condensation aldolique de la DHA protégée **39** sur l'isovaléraldéhyde en présence de L-proline (Figure 144).

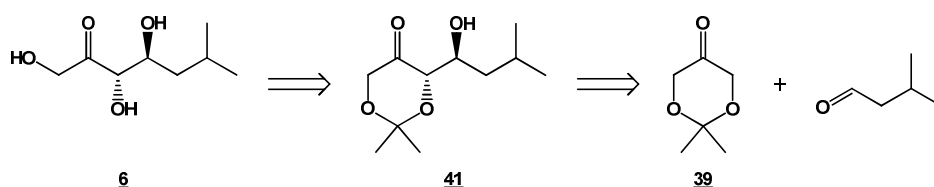


Figure 144 : Rétrosynthèse du composé **6**

### 2.2.1.1. Synthèse du composé **41** en présence de L-proline

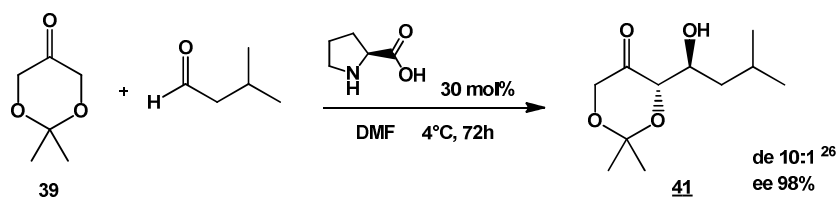


Figure 145 : Synthèse du composé **41** en présence de L-proline

La synthèse du composé **41** a été effectuée selon une méthode décrite dans la littérature par Barbas et al.<sup>146</sup> en présence de L-proline. Ce protocole repose sur l'utilisation d'un large excès de DHA protégée (5 équivalents) en présence d'isovaléraldéhyde dans le DMF. La réaction se déroule à  $4\text{ }^\circ\text{C}$  pendant 72 heures. Les premiers essais réalisés en suivant

cette méthode ont conduit à de faibles rendements (20 %) et nous ont permis de mettre en évidence le composé **42** issu de l'autocondensation de la DHA protégée **39**.

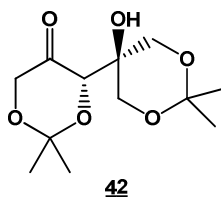


Figure 146 : Structure du composé **42** issue de l'autocondensation du composé **39**

Afin de limiter cette réaction secondaire d'autocondensation, l'excès de DHA protégé **39** a été ramené à 1,5 équivalent. Dans ces conditions, le composé **41** a été obtenu avec un rendement de 50 %. L'analyse des spectres  $^1\text{H}$  RMN (deux doublets à 4,02 et 4,17 ppm présentant une constante de couplage de 17,6 Hz correspondant aux protons portés par le carbone 1) et  $^{13}\text{C}$  RMN (présence à d'un pic à 210,9 ppm correspondant au carbonyle et d'un pic à 100,9 ppm correspondant au carbone quaternaire de l'acétonide) a permis de confirmer la présence du composé **41**. Les déplacements chimiques et les constantes de couplage obtenues RMN  $^1\text{H}$  sont identiques aux valeurs obtenues par Barbas et al., ceci nous a permis de montrer que le composé **41** présenterait une configuration *anti*.

#### 2.2.1.2. Hydrolyse de l'acétonide du composé **41**

Le composé **6** a été obtenu par hydrolyse de l'acétonide du composé **41** en conditions acides (Figure 147).

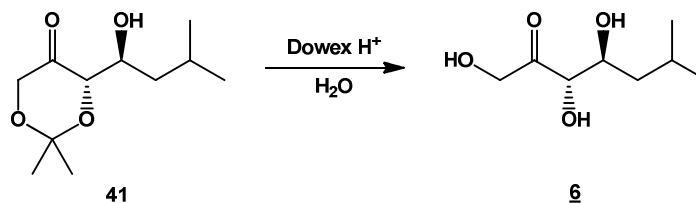


Figure 147 : Hydrolyse de l'acétonide du composé **41**

Cette étape de déprotection a été réalisée en milieux aqueux en présence de résine Dowex H<sup>+</sup>. Après purification par recristallisation, le composé **6** est obtenu sous la forme d'un solide blanc avec un rendement de 50 %. L'analyse des spectres  $^1\text{H}$  RMN (présence de deux doublets caractéristiques à 4,36 et 4,47 ppm présentant une constante de couplage de 19,4 Hz correspondant aux deux protons du carbone 1) et  $^{13}\text{C}$  RMN (disparition du pic correspondant à l'acétonide à 100,9 ppm) permet de confirmer la présence du composé **6**.

#### 2.2.1.3. Conclusion

Le composé **6** a été obtenu à partir de la DHA protégée **39** et de l'isovaléraldéhyde en deux étapes avec un rendement global de 25 % en deux étapes seulement.

### 2.3. Synthèse du composé **7**

Nous avons envisagé d'obtenir le groupement thiométhyle du composé **7** à partir du groupement thioacétyle (**45**) via une désacétylation puis méthylation. Le motif cétose L-érythro du composé **7** a été généré à partir du composé **45** obtenu par condensation aldolique de la DHA protégée **39** et de l'aldéhyde **43** en présence de L-proline.

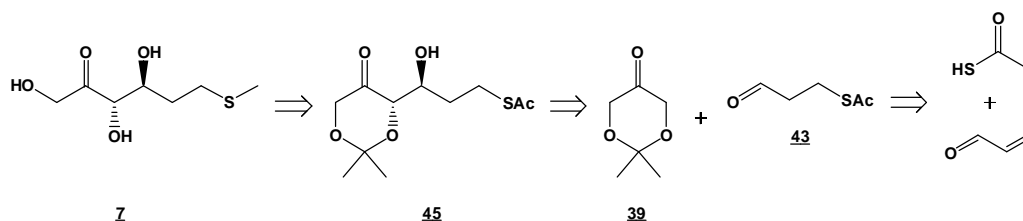


Figure 148 : Rétrosynthèse du composé **7**

#### 2.3.1. Synthèse de l'aldéhyde **43**

La synthèse de l'aldéhyde accepteur **43** a été réalisée selon une méthode décrite dans la littérature<sup>153</sup> (Figure 149). La réaction est effectuée par ajout d'acide thioacétique dans l'acroléine à une température de  $-10^{\circ}\text{C}$ . L'acide thioacétique s'additionne sur l'acroléine selon une réaction d'addition de type 1,4 pour donner le composé **43**. Cependant, cette réaction d'addition est en compétition avec une addition de type 1,2 qui conduit au composé thiohémiacétal **44**, dont la présence a été révélée par l'analyse du spectre  $^1\text{H}$  RMN du brut réactionnel mais n'a pas été isolé.

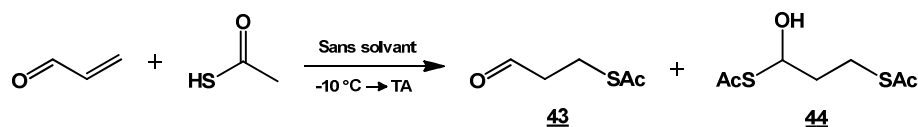


Figure 149 : Voie de synthèse de l'aldéhyde **43**

Après purification par distillation<sup>154</sup>, le composé **43** est obtenu sous la forme d'une huile incolore avec un rendement de 60 %. L'analyse des spectres  $^1\text{H}$  RMN (présence d'un proton aldéhydique à 9,73 ppm) et  $^{13}\text{C}$  RMN (présence de deux pics à 195,6 et 199,9 ppm correspondant respectivement aux carbonyles du groupement acétyle et de la fonction aldéhyde) permet de confirmer la présence du composé **43**.

#### 2.3.2. Réaction d'aldolisation par organocatalyse

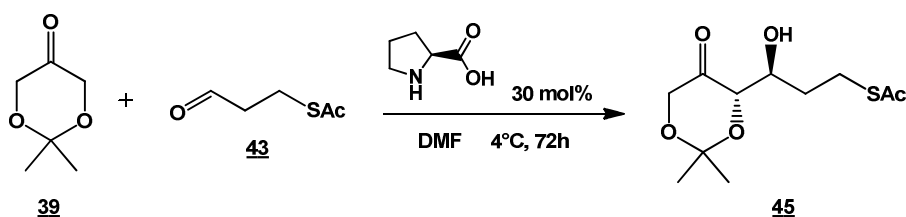


Figure 150 : Synthèse du composé **45** en présence de L-proline

La réaction d'aldolisation est réalisée avec un léger excès de DHA protégée **39** (1,2 équivalent) en présence de l'accepteur **43** et de L-proline dans le DMF à une température de 4 °C pendant 90 heures. Après purification sur gel de silice éclair, le composé **45** a été obtenu sous la forme d'une huile visqueuse légèrement jaune avec un rendement de 25 %. Dans ce cas également, l'apparition du produit d'autocondensation **42** (Figure 146) a été observée (par analyse  $^1\text{H}$  RMN du brut réactionnel). La présence du composé **45** a été confirmée par l'analyse des spectres  $^1\text{H}$  RMN (deux doublets à 4,00 et 4,23 ppm présentant un constante de couplage de 17,4 Hz) et  $^{13}\text{C}$  RMN (présence d'un groupe carbonyle à 210,7 ppm et du carbone quaternaire de l'acétonide à 101,1 ppm). Compte-tenu du faible rendement, l'autocondensation de la DHA protégée **39** est encore plus favorisée dans ce cas. Elle pourrait être limitée par l'ajout fractionnée de celle-ci au cours de la réaction.

### 2.3.3. Désacétalysation et méthylation de la fonction thiol

Les méthodes d'alkylations du groupement thioacétyle cités dans la littérature<sup>155</sup> s'effectuent dans le DMF en présence de diéthylamine et de bromure d'alkyle.

#### ➤ Voie A

Les premiers essais de méthylation ont été réalisés selon les conditions décrites dans la littérature en présence d'iodure de méthyle, mais le composé isolé à l'issue de la réaction n'est pas le composé S-méthylé attendu (Figure 151). Nous avons obtenu un nouveau composé vraisemblablement **46** que nous n'avons pu caractériser par les techniques d'analyse classique. Pour élucider sa structure, nous avons décidé d'hydrolyser l'acétonide en présence de Dowex  $\text{H}^+$ . Le composé identifié par RMN correspond au composé **47**.

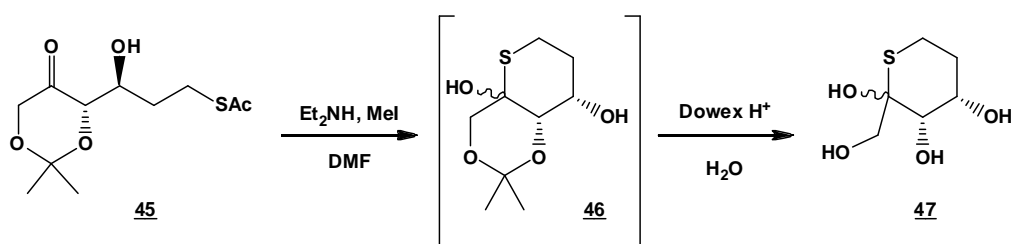


Figure 151 : Synthèse du composé **47**

#### ➤ Voie B

Pour éviter la réaction de cyclisation observée dans la voie A, nous avons décidé de développer une autre approche dans laquelle la fonction cétone est masquée sous forme d'acétal méthylique afin d'empêcher la cyclisation (Figure 152).

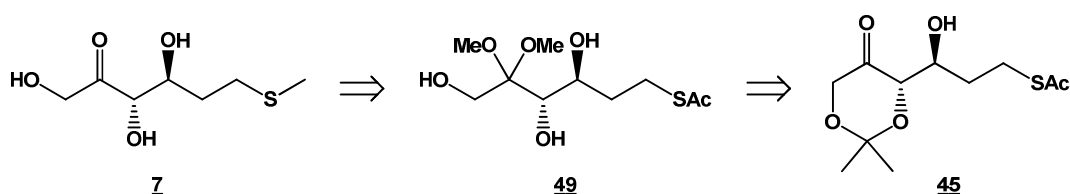


Figure 152 : Rétrosynthèse du composé **7**

■ Hydrolyse de l'acétonide du composé **45** : Dans un premier temps, l'acétonide du composé **45** a dû être hydrolysé afin de limiter la formation de différents produits secondaires lors de l'étape d'acétylisation de la fonction cétone.

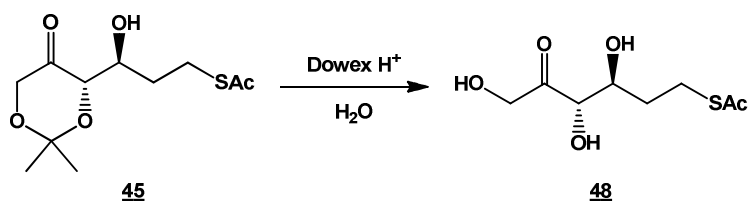


Figure 153 : Hydrolyse de l'acétonide du composé **45**

Cette réaction a été réalisée en milieu aqueux en présence de Dowex  $H^+$  en tant que catalyseur acide. Le composé **48** est obtenu sous la forme d'une huile incolore avec un rendement de 95 %. L'analyse des spectres  $^1H$  RMN (présence de deux doublets caractéristiques à 4,40 et 4,50 ppm présentant une constante de couplage de 19,2 Hz) et  $^{13}C$  RMN (disparition du pic caractéristique de l'acétonide à 101,1 ppm) permet de confirmer la présence du composé **48** dont l'atome de soufre est protégé par un groupement acétal (présence en RMN des signaux caractéristiques).

■ Acétalisation du carbonyle du composé **48**

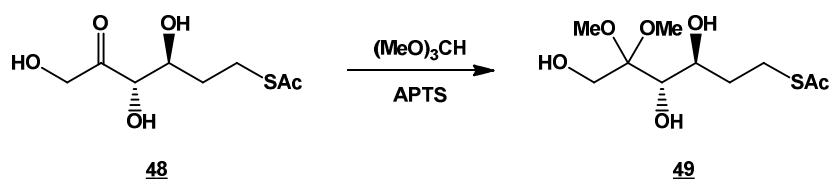


Figure 154 : Acétalisation du carbonyle du composé **48**

La protection de la fonction cétone du composé **48** est réalisée en présence d'orthoformiate de méthyle jouant à la fois le rôle de réactif et de solvant évitant ainsi toute présence d'eau. Après purification le composé **49** est obtenu sous la forme d'une huile incolore avec un rendement de 60 %. L'analyse des spectres  $^1H$  RMN (présence de deux singulets à 3,19 et 3,32 ppm intégrant chacun pour 3 hydrogènes représentant les groupements méthoxy-) et  $^{13}C$  RMN (disparition du pic caractéristique de la cétone à 212,9 ppm) met en évidence la protection de la cétone.



■ Méthylation de la fonction thiol du composé **49**

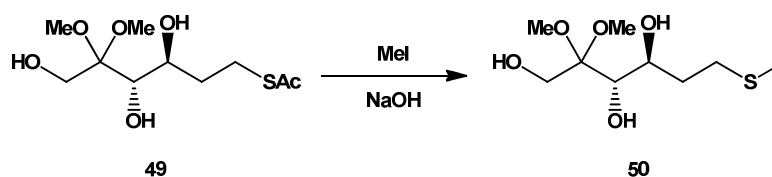


Figure 155 : Méthylation de la fonction thiol du composé **49**

La déprotection et la méthylation sont effectuées en utilisant une méthode décrite dans la littérature<sup>156</sup> utilisant des conditions douces. L'étape de déprotection est réalisée par action d'une solution aqueuse de soude (2M) dans l'éthanol. L'étape de méthylation est effectuée par addition d'iodure de méthyle. Le composé **50** est obtenu sans purification préalable avec un rendement quantitatif. L'analyse des spectres <sup>1</sup>H RMN (présence d'un singulet à 2,06 ppm intégrant pour 3 hydrogènes représentant le groupement méthyl-) et <sup>13</sup>C RMN (disparition du pic caractéristique du carbonyle du groupement protecteur du soufre à 195,6 ppm) met en évidence la présence du composé **50**.

■ Déprotection du composé **50**

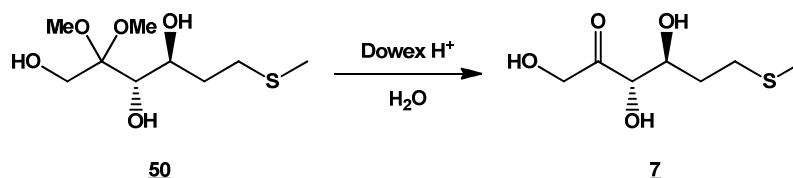


Figure 156 : Déprotection du composé **50**

La déprotection du composé **50** est effectuée dans un mélange binaire méthanol / eau en présence d'une résine acide. L'utilisation de méthanol est nécessaire compte-tenu de la faible solubilité du composé **50** dans l'eau. Après purification sur gel de silice, le composé **7** est obtenu avec un rendement de 66 % pour les deux étapes. L'analyse des spectres <sup>1</sup>H RMN (disparition des deux singulets à 3,18 et 3,31 ppm caractéristiques des deux groupements méthoxy) et <sup>13</sup>C RMN (présence du pic caractéristique de la fonction cétone à 213 ppm) met en évidence la déprotection du cétose **7**.

## 2.4. Bilan des synthèses des composés cétose L-érythro 6 et 7

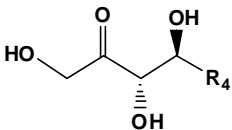
	<b>6</b> R <sub>4</sub> = CH <sub>2</sub> -CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	<b>7</b> R <sub>4</sub> = CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> SCH <sub>3</sub>
	25 %	5 %

Tableau 24 : Rendements des synthèses conduisant aux sondes **6** et **7**

Le motif cétose L-érythro de la sonde **6** (R<sub>4</sub> = CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) a été obtenu en présence de L-proline avec un rendement global de 25 %. En revanche la préparation de la sonde **7** (R<sub>4</sub> = CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>) a été plus délicate en raison de la présence de l'atome de soufre sur la chaîne latérale. La stratégie utilisée nous a permis d'obtenir dans un premier temps en présence de L-proline le composé **45** dont l'atome de soufre est protégé par un acétal. Les rendements sont nettement inférieurs à ceux obtenus pour la sonde **6**. Il est à noter que la synthèse de composés présentant un hétéroatome sur le groupement R n'a pas été décrite dans la littérature par organocatalyse en présence de L-proline. D'autre part la méthylation du soufre a été délicate en raison de la cyclisation de la molécule traitée en présence d'iodure de méthyle. Une stratégie indirecte nous a conduit au composé souhaité *via* la protection de la fonction cétone mais avec un rendement global de 5 %. Cette stratégie devra être optimisée notamment en utilisant d'autres groupements protecteurs de l'atome de soufre. De plus, les ee et de de la molécule finale restent à déterminer par HPLC chirale.

## 3. Synthèse des sondes présentant le motif aldose D-thréo

L'objectif est d'utiliser ces sondes pour sélectionner des TK mutées capables de reconnaître le motif aldose D-thréo. Dans ce cas les TK recherchées devront être capable de transférer un groupement formyle à la place du groupement hydroxyacétyle transféré par la TK sauvage.

Les sondes aldoses D-thréo envisagées portent les chaînes latérales de la leucine et de la méthionine. En effet, nous verrons dans la partie consacrée à la mise au point du test de sélection en présence de la TK sauvage que les cétooses-D-thréo précurseurs de leucine et de la méthionine ont été privilégiés.

Les sondes présentant le motif aldose D-thréo dont la synthèse a été envisagée sont indiquées ci-dessous :

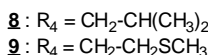
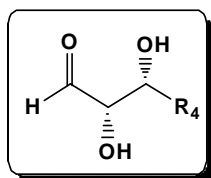


Figure 157 : Sondes aldose D-thréo

### 3.1. Stratégies pour accéder au motif aldose D-thréo

Nous avons tout d'abord développé une voie chimique reposant sur la réaction de dihydroxylation asymétrique de Sharpless, stratégie particulièrement adaptée à la synthèse des aldoses (voie **A**). Puis, nous avons développé une autre approche basée sur la coupure oxydante des composés cétose D-thréo **3** et **4** que nous avons obtenu en quantité significative grâce à la réaction catalysée par la FSA (voie **B**).

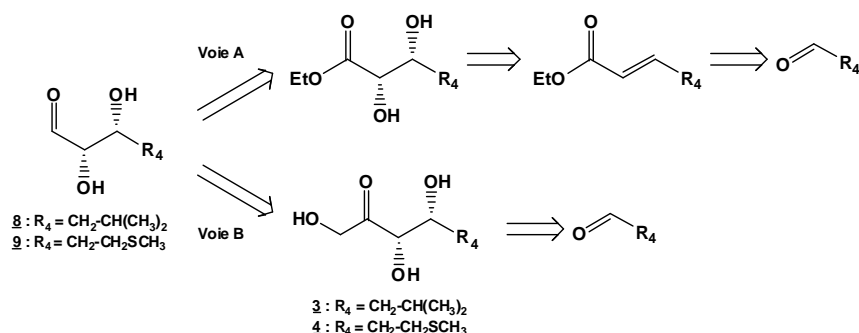


Figure 158 : Rétrosynthèse des composés **8** et **9**

### 3.2. Synthèse du composé 8

#### 3.2.1. Voie A

Cette stratégie est basée sur la réaction de dihydroxylation asymétrique de Sharpless (Figure 159), réalisée sur l'ester  $\alpha,\beta$ -insaturé **51** obtenu à partir de l'isovaléraldéhyde par une réaction de type Wittig-Horner-Emmons. La fonction aldéhyde du composé **8** est générée par réduction de l'ester **52** dont les groupements hydroxyles ont été protégés sous forme d'acétonide.

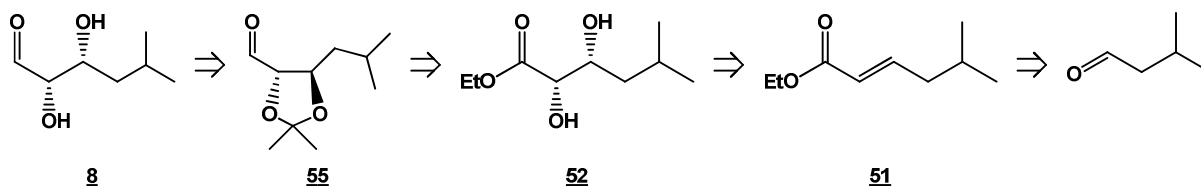
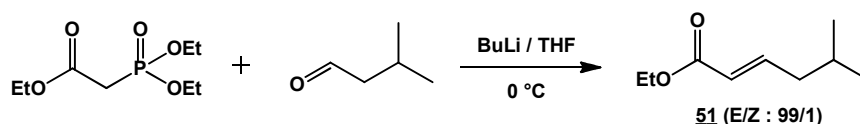


Figure 159 : Voie A envisagée pour accéder au composé **8**

➤ Synthèse du composé **51**

Nous avons obtenu le composé **51** selon une réaction de type Wittig-Horner-Emmons décrite dans la littérature<sup>157</sup>. La réaction est réalisée à 0 °C pendant deux heures après addition de l'aldéhyde.

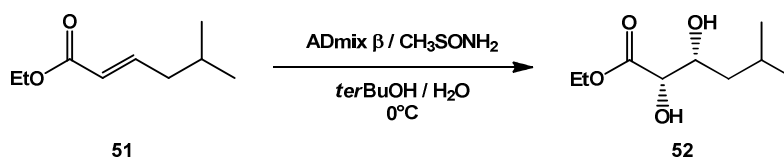


**Figure 160 : Réaction de Wittig-Horner-Emmons**

La déprotonation en  $\alpha$  du carbonyle du triéthyle phosphonoacétate au moyen du butyrate de lithium (BuLi) permet d'obtenir un intermédiaire réactionnel stabilisé. Après addition de l'isovaléraldéhyde, cet intermédiaire stabilisé conduit à la formation d'un intermédiaire oxaphosphétane de configuration *anti* qui subit un réarrangement pour donner l'alcène **51** de configuration *E*.

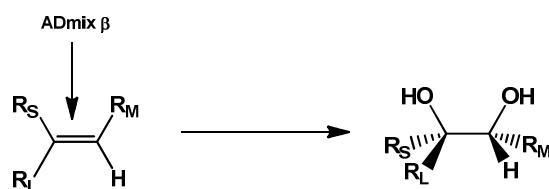
Après purification sur gel de silice éclair, le composé **51** est obtenu sous la forme d'un liquide incolore avec un rendement de 85 %. L'analyse des spectres  $^1\text{H}$  RMN (deux triplets dédoublés à 5,81 et 6,94 ppm avec une constante de couplage de 15,6 Hz correspondant aux deux protons éthyléniques) et  $^{13}\text{C}$  RMN (présence de trois signaux à 122,3 ; 148,2 et 166,7 ppm correspondant respectivement aux deux carbones éthyléniques et au groupe carbonyle de l'ester) permet de confirmer la présence du composé **51** de configuration *E*, ainsi que la présence du diastéréoisomère *Z* selon un rapport E/Z : 99/1 conformément à la littérature.

➤ Dihydroxylation asymétrique du composé **51**



**Figure 161 : Dihydroxylation asymétrique du composé **51****

Le composé **52** a été obtenu par dihydroxylation asymétrique de Sharpless sur le composé **51**. Cette réaction est effectuée à 0 °C sur une durée de 20 heures dans un milieu réactionnel biphasique composé de *ter*butanol et d'eau (Figure 161). Le réactif utilisé est l'ADmix  $\beta$ , un mélange commercial contenant de l'osmate de potassium ( $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ ) en tant qu'agent oxydant et de l'hydroquinidine 1,4-phthalazinediyle diéther (DHQD<sub>2</sub>PHAL) en tant qu'agent chiral. En présence d'un ester  $\alpha,\beta$ -insaturé de configuration *E*, ce réactif permet d'obtenir l'ester  $\alpha,\beta$ -hydroxylé de configuration (3*S*,4*R*) (Figure 159)<sup>158</sup>. Le méthane sulfonamide agit en tant que catalyseur acide, ce qui conduit à de meilleurs rendements<sup>159</sup>.



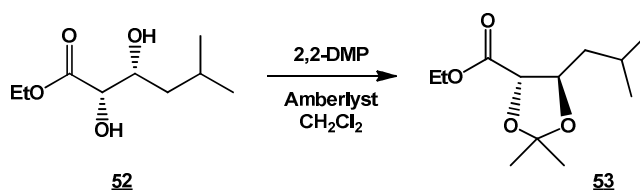
(substituents :  $R_S$  : petite taille ;  $R_M$  : moyenne taille ;  $R_L$  : grande taille)

**Figure 162 : Enantiosélectivité de la dihydroxylation de Sharpless en présence d'ADmix  $\beta$**

Après purification sur gel de silice éclair, le composé **52** est obtenu sous la forme d'une huile incolore avec un rendement de 90 %. L'analyse des spectres  $^1\text{H}$  RMN montre la présence d'un doublet à 4,04 ppm correspondant au proton du carbone 2 portant le groupe hydroxyle et d'un doublet dédoublé dédoublé à 3,97 ppm correspondant au proton du carbone 3 portant le groupe hydroxyle. L'analyse des spectres  $^{13}\text{C}$  RMN indique la présence des deux carbones 2 et 3 respectivement à 76,6 et 70,6 ppm.

➤ Protection des fonctions alcools du composé **52**

Nous avons choisi de protéger les deux fonctions hydroxyles sous la forme d'un acétonide (Figure 163).



**Figure 163 : Protection des fonctions alcools du composé **52****

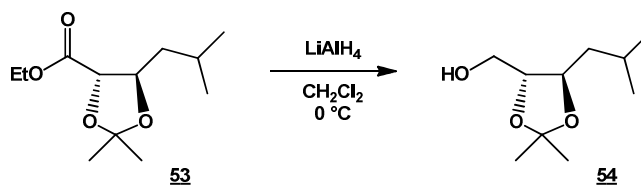
La réaction a été réalisée selon des conditions décrites<sup>160</sup> dans la littérature en une heure à température ambiante en présence d'un large excès (5 équivalents) de 2,2-diméthoxypropane (2,2-DMP) et d'Amberlyst® 15. Après purification sur gel de silice éclair, le composé **53** a été obtenu sous la forme d'un liquide incolore avec un rendement de 97 %. La présence du composé **53** a été confirmé par l'analyse des spectres  $^1\text{H}$  RMN (doublet à 4,05 ppm ppm correspondant au proton porté par le carbone 2 et d'un triplet dédoublé à 4,16 ppm correspondant au proton du carbone 3) et  $^{13}\text{C}$  RMN ( signaux à 77,7 et 79,7 ppm correspondants respectivement au carbone 3 et carbone 2).

➤ Réduction partielle de la fonction ester en aldéhyde

Les premiers essais de réduction partielle basés sur l'utilisation du DIBAL-H ont conduit à la formation d'un mélange de produits instables et difficilement séparables. Nous avons donc choisi de réaliser la réduction en deux étapes : une étape de réduction totale pour

obtenir l'alcool correspondant, suivie d'une étape d'oxydation douce afin d'obtenir l'aldéhyde.

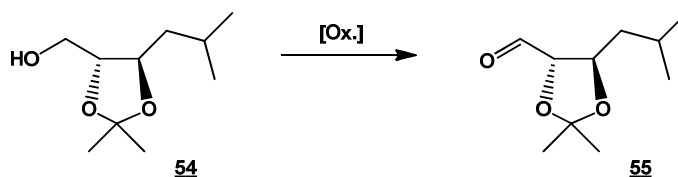
#### ■ Réduction de l'ester du composé **53**



**Figure 164 : Réduction de la fonction ester du composé **53****

Cette étape de réduction a été réalisée en présence d'hydrure d'aluminium et de lithium ( $\text{LiAlH}_4$ ) dans le tétrahydrofurane à 0 °C. La réaction a été suivie par CCM et montre la disparition complète du composé **53** et l'apparition d'un nouveau composé plus polaire qui n'a pas été purifié et a été engagé directement dans l'étape suivante.

#### ■ Oxydation douce de la fonction alcool du composé **54**



**Figure 165 : Oxydation douce de la fonction alcool du composé **54****

Pour cette étape d'oxydation dans des conditions douces, nous avons envisagé différentes méthodes largement décrites dans la littérature : l'oxydation de Swern, le chlorochromate de pyridinium, le dichromate de pyridinium, le périodine de Dess-Martin et l'acide iodoxybenzoïque (IBX). Finalement, seules les méthodes utilisant l'IBX nous a permis d'obtenir le composé **55** avec les meilleurs rendements.

Après purification par chromatographie sur gel de silice éclair, le composé **55** a été obtenu sous la forme d'une huile incolore avec un rendement de 75 %. Le composé **55** a été identifié par l'analyse des spectres  $^1\text{H}$  RMN (présence d'un proton aldéhydique à 9,71 ppm) et  $^{13}\text{C}$  RMN (disparition du carbone de la fonction alcool primaire à 62,8 ppm et apparition d'un carbonyle à 201,2 ppm).

#### ➤ Déprotection de l'acétonide

Cette étape de déprotection a tout d'abord été réalisée en conditions aqueuses acides, mais cette approche a conduit à la formation d'un mélange de produits sans obtenir une

disparition totale du composé **55**. Nous avons finalement envisagé une méthode « moins classique » en présence d'iode décrite dans la littérature<sup>161</sup>.

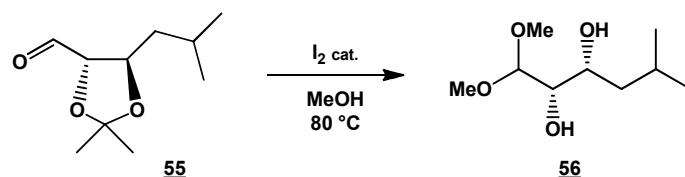


Figure 166 : Déprotection de l'acétonide du composé **55**

Cette réaction a été réalisée en présence d'iode en quantité catalytique (0,03 équivalent) dans le méthanol à 80 °C. Après purification sur gel de silice éclair, nous avons obtenu le composé **56** qui présente une fonction aldéhyde masquée sous la forme d'un acétal méthylique. Ce composé a été obtenu sous la forme d'une huile incolore avec un rendement de 69 %. L'analyse des spectres <sup>1</sup>H RMN (disparition des protons des groupements méthyles de l'acétonide et apparition du proton du carbone portant l'acétal à 4,4 ppm) et <sup>13</sup>C RMN (disparition des carbones de l'acétonide à 26,2 ; 27,2 et 110,9 ppm et apparition d'un carbone à 106,4 ppm correspondant à l'acétal méthylique) a permis de confirmer la présence du composé **56**. A l'issu de cette étape, le composé **56** n'était pas celui que nous envisagions d'obtenir, mais la protection de la fonction aldéhydique sous forme d'acétal s'est avérée efficace.

#### ➤ *Hydrolyse de l'acétal*

Nous avons réalisé cette étape de déprotection en présence de résine Dowex H<sup>+</sup> dans l'eau à 40 °C.

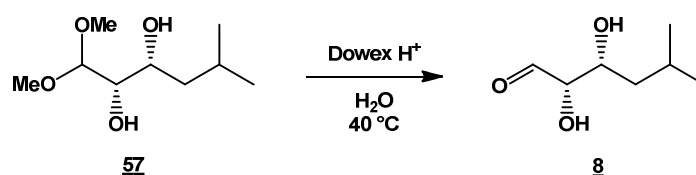


Figure 167 : Hydrolyse de l'acétal du composé **57**

La caractérisation du composé **8** a été réalisée par dérivatisation de la fonction aldéhyde en phényl hydrazone. L'analyse des spectres RMN<sup>1</sup>H confirme l'obtention de la N,N-phénylhydrazone par la présence entre autre des protons aromatiques (7,09 (4H) ; 7,17 (2H) ; 7,39 (4H) ppm) et du proton caractéristique du carbone de la fonction hydrazone (CH=N-N) à 6,56 ppm.

### ➤ Conclusion

Le composé **8** a été obtenu sous forme protégée (composé **57**) en 6 étapes avec un rendement global satisfaisant de 31 %. Les deux étapes critiques se sont révélées être la réduction ménagée de l'ester en aldéhyde que nous avons du finalement réalisé en deux temps (une étape de réduction totale suivie d'une étape d'oxydation ménagée) et l'étape de déprotection de l'acétonide, qui nous a finalement permis d'obtenir la fonction aldéhyde masquée sous forme d'acétal. L'étape finale de déprotection a conduit à la formation du composé **8** que nous avons obtenu en solution. Le composé **8** sera conservé sous sa forme protégée.

### 3.2.2. Voie B

L'autre approche envisagée pour accéder à la chiralité souhaitée (2*S*, 3*R*) consiste à utiliser le cétose D-thréo **3** obtenu précédemment qui par réduction du groupe carbonyle puis coupure oxydante de la liaison C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> va permettre de générer la fonction aldéhyde de l'aldose, les groupements hydroxyyles ayant été protégés au préalable.

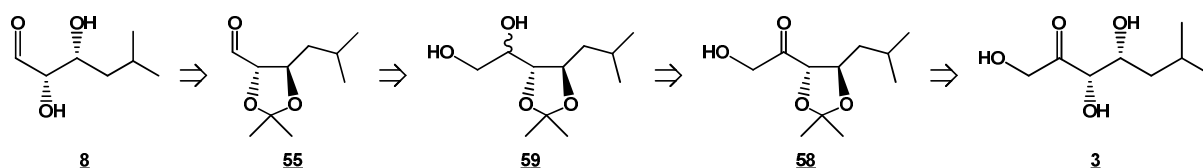


Figure 168 : Synthèse chimique de l'aldose D-thréo **8** à partir du cétose D-thréo **3** correspondant

### ➤ Protection des deux fonctions alcools secondaires sous forme d'acétonide

Dans la littérature, il existe des méthodes pour obtenir sélectivement l'acétonide à 5 chaînons au détriment de celui à 6 chaînons<sup>162,163</sup>. Bien que ces méthodes reposent essentiellement sur l'utilisation d'acides de Lewis comme catalyseurs (tels que ZnI<sub>2</sub> ou ZnCl<sub>2</sub>), nous nous sommes appuyés sur une publication<sup>164</sup> qui décrit la formation régiosélective d'acétonide sur des composé similaires au composé **3** en utilisant des conditions classiques, c'est-à-dire l'acide paratoluène sulfonique comme catalyseur dans l'acétone (Figure 169).

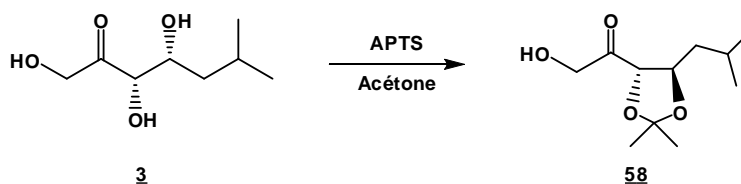


Figure 169 : Protection du composé **3** sous forme d'acétonide



Dans ces conditions, le composé **58** a été obtenu après purification par chromatographie sur gel de silice éclair sous forme d'une huile incolore avec un rendement de 84 %. L'analyse du spectre  $^1\text{H}$  RMN (deux singulets à 1,41 ppm et 1,44 ppm correspondant au groupement acétonide) a permis de confirmer la présence du composé **58**.

➤ Réduction de la fonction cétone

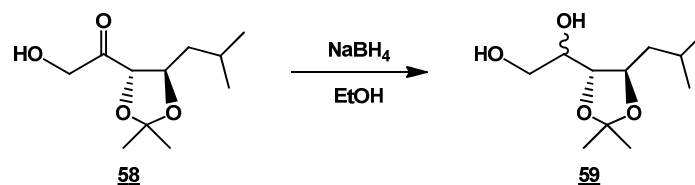


Figure 170 : Réduction de la fonction cétone du composé **58**

Un protocole décrit dans la littérature<sup>165</sup> a été suivi en présence de 1,5 équivalents de borohydrure de sodium dans l'éthanol à 0 °C (Figure 170). Après chromatographie sur gel de silice éclair, le composé **59** est obtenu sous la forme d'une huile incolore avec un rendement de 82 %. D'après l'analyse des spectres  $^1\text{H}$  RMN et  $^{13}\text{C}$  RMN deux diastéréoisomères sont obtenus en proportions identiques. Bien que ces derniers soit séparables en CCM, nous n'avons pas essayé de les séparer. En effet, l'étape suivante est une coupure oxydante de la liaison  $\text{C}_1\text{-C}_2$  au cours de laquelle nous perdons la stéréochimie du carbone asymétrique formé au cours de l'étape de réduction. La réduction de la fonction cétone est confirmée par la présence du proton porté par le carbone 2 à 4,03 ppm pour l'un des deux diastéréoisomères et à 4,11 ppm pour l'autre.

➤ Coupure oxydante du diol

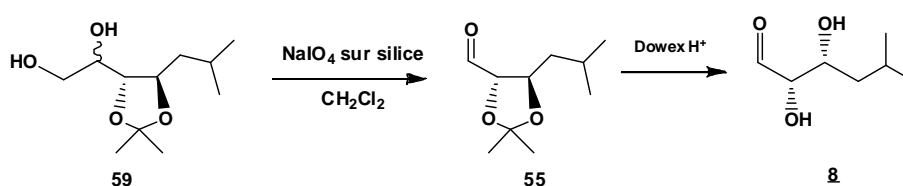


Figure 171 : Coupure oxydante du diol **59**

Cette étape a été réalisée dans le dichlorométhane en présence de métapériodate de sodium (supporté sur silice) comme agent oxydant selon un protocole décrit dans la littérature<sup>166</sup>. Après purification par chromatographie sur gel de silice éclair, le composé **55** est obtenu sous forme d'une huile incolore avec un rendement de 93 %. L'analyse des spectres  $^1\text{H}$  RMN (disparition des protons du méthylène portant le groupement hydroxyle primaire à 4,03 et 4,11 ppm pour chacun des deux diastéréoisomères et apparition d'un seul

proton aldéhydique à 9,7 ppm) et  $^{13}\text{C}$  RMN (disparition des carbones de l'alcool primaire à 63,8 et 65 ppm des deux diastérisomères et apparition d'un seul carbonyle à 201,2 ppm) a permis de confirmer la présence du composé **55**. La caractérisation du composé **8** a été réalisée par dérivatisation de la fonction aldéhyde en phényl hydrazone. L'analyse des spectres RMN $^1\text{H}$  est identique à celui obtenu précédemment (Voie A).

### ➤ Conclusion

La voie **A** a permis d'obtenir le composé **55** en 5 étapes à partir de l'isovaléraldéhyde avec un rendement global de 45 %, la voie **B** en 4 étapes avec un rendement global de 50 % à partir du composé **3** préparé par aldolisation catalysée par la FSA avec un rendement de 77 %. Il est à noter que la voie chimioenzymatique est plus simple à mettre en œuvre.

## 3.3. Synthèse du composé 9

### 3.3.1. Voie A

Nous avons utilisé la stratégie basée sur la réaction de dihydroxylation asymétrique de Sharpless (Figure 172).

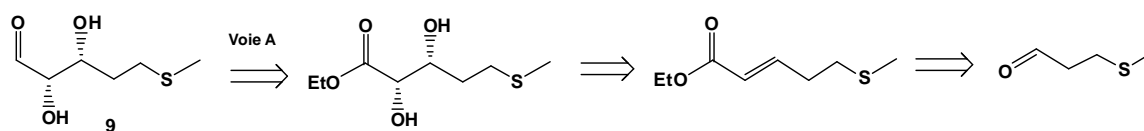


Figure 172 : Voie A envisagée pour accéder au composé **9**

Cette voie d'accès au composé **9** n'a pas pu être réalisée car la réaction de Wittig-Horner-Emmons ne nous a pas permis d'obtenir l'alcène correspondant à partir du méthional.

### 3.3.2. Voie B

Nous avons envisagé la voie de synthèse **B** à partir du cétose *D*-thréo **4** comme précurseur chiral (préparé en présence de FSA) selon la stratégie décrite précédemment.

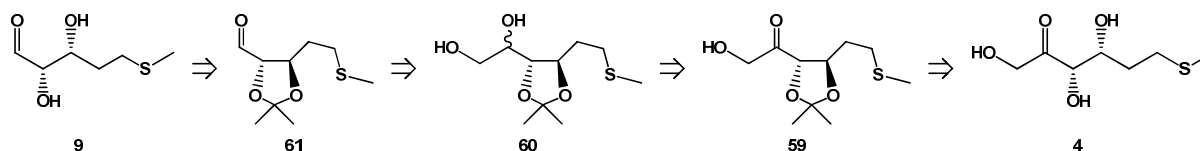
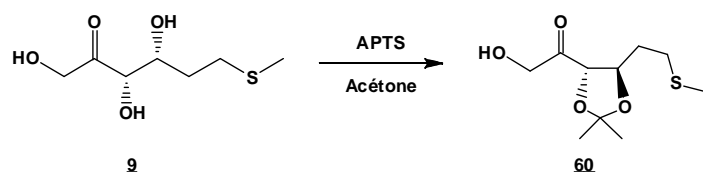


Figure 173 : Synthèse chimique de l'aldose *D*-thréo **9** à partir du cétose *D*-thréo **4** correspondant

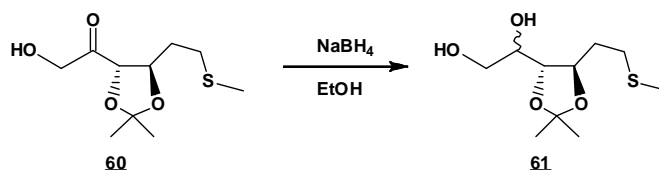
➤ Protection des deux alcools secondaire sous forme d'acétonide



**Figure 174 : Protection des deux fonctions alcools secondaire sous forme d'acétonide**

En présence d'acide paratoluène sulfonique comme catalyseur dans l'acétone, le composé **60** a été obtenu sous forme d'une huile incolore avec un rendement de 63 % après purification par chromatographie sur gel de silice éclair. L'analyse des spectres  $^1\text{H}$  RMN (deux singulets correspondants aux deux groupements méthyles de l'acétonide à 1,39 ppm et 1,42 ppm) et  $^{13}\text{C}$  RMN (présence de signaux à 26,1 ; 27,1 et 110,9 ppm correspondants aux carbones de l'acétonide) a permis de confirmer la présence du composé **60**.

➤ Réduction de la fonction cétone



**Figure 175 : Réduction de la fonction cétone du composé 60**

En présence de 1,5 équivalents de borohydrure de sodium dans l'éthanol, nous avons obtenu le composé **61** sous la forme d'une huile incolore avec un rendement de 76 % après purification par chromatographie sur gel de silice éclair. D'après l'analyse des spectres  $^1\text{H}$  RMN et  $^{13}\text{C}$  RMN deux diastéréoisomères sont obtenus en proportions identiques. Bien que ces derniers soit séparables en CCM, nous n'avons pas essayé de les isoler. En effet, l'étape suivante est une coupure oxydante de la liaison  $\text{C}_1\text{-C}_2$  au cours de laquelle nous perdons la stéréochimie du carbone asymétrique formé au cours de l'étape de réduction. L'analyse des spectres  $^1\text{H}$  RMN montre la présence d'un singulet large à 2,74 ppm correspondant au groupement hydroxyle des deux diastéréoisomères. L'analyse des spectres  $^{13}\text{C}$  RMN indique deux signaux correspondants au carbone 2 portant le groupe hydroxyle respectivement à 72,8 ppm et 69,9 ppm pour les deux diastéréoisomères.

➤ Coupure oxydante du diol

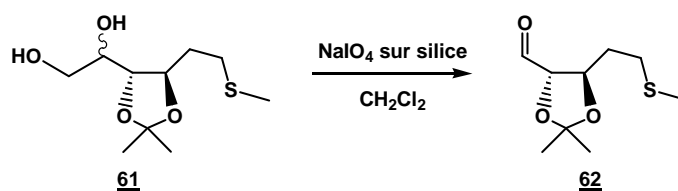


Figure 176 : Synthèse du composé **62** par coupure oxydante du composé **61**

Cette étape a été réalisée dans le dichlorométhane en présence de métapériodate de sodium (supporté sur silice) comme agent oxydant et a conduit à un mélange de composés difficilement analysables. De toute évidence, il doit s'agir d'un mélange de sulfoxydes et sulfone à partir duquel nous n'avons pas pu isoler le composé **62**.

➤ Conclusion

Les deux premières étapes ont été concluantes puisque nous avons obtenu les composés attendus avec des rendements, certes plus faibles que dans le cas de l'aldose **8** mais corrects : 63 % et 76 % respectivement. En revanche, la coupure oxydante n'est pas réalisable en présence du composé **61**.

Une autre stratégie pourrait consister à introduire le groupement thiométhyle après la coupure oxydante. Le cétose précurseur (X= halogène) pourrait être obtenu par voie enzymatique.

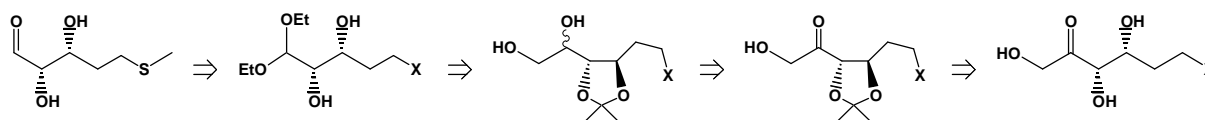


Figure 177 : Stratégie alternative pour accéder au composé **9**

## 4. Conclusion

Le schéma ci-dessous indique les stratégies développées pour accéder aux sondes **1** à **8**, la chiralité étant créée par formation stéréospécifique d'une liaison C-C grâce à des enzymes ou à l'organocatalyse ou encore selon la dihydroxylation asymétrique de Sharpless (Figure 178).

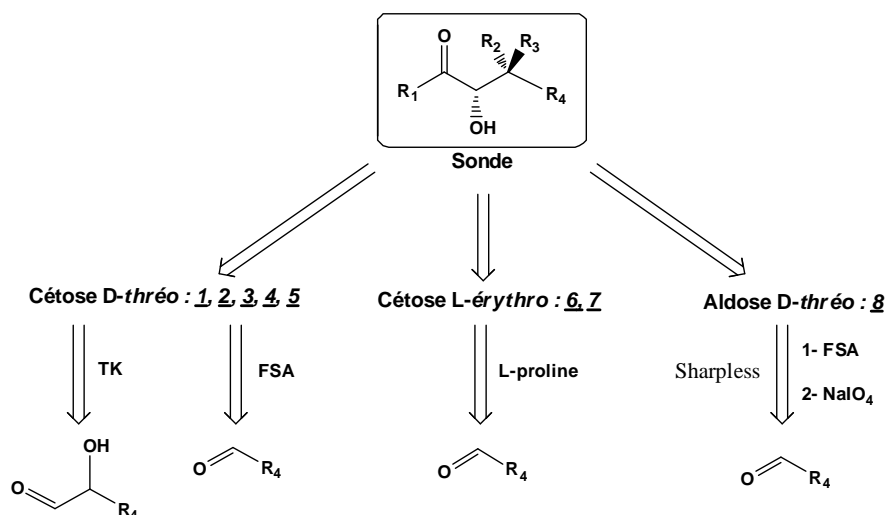


Figure 178 : stratégies développées pour accéder aux composés **1** à **8**

Les rendements des voies de synthèse développées pour accéder aux sondes **1** à **8** sont indiqués dans le Tableau 25.

Motif (R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> , R <sub>3</sub> )				Chaîne latérale (R <sub>4</sub> )				
				Alanine	Valine	Leucine	Méthionine	Thréonine
Nom	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> -CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> SCH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> OH-CH <sub>3</sub>
Cétose D-thréo	CH <sub>2</sub> OH	OH	H	<b>1</b> TK : 23 % FSA : 71 %	<b>2</b> TK : 2 %	<b>3</b> TK : 16 % FSA : 77 %	<b>4</b> TK : 31 % FSA : 67 %	<b>5</b> TK : NE FSA : 55 %
Cétose L-érythro	CH <sub>2</sub> OH	H	OH			<b>6</b> : 25 %	<b>7</b> : 5 %	
Aldose D-thréo	H	OH	H			<b>8</b> : 31 %		

(NE = non effectué NR = pas de réaction)

Tableau 25 : Rendements globaux des voies de synthèse conduisant aux composés **1** à **8**

Les huit sondes que nous avons synthétisées ont une structure originale puisqu'elles présentent à la fois un motif cétose-D-thréo (**1**, **3**, **4**, **5**) ou L-érythro (**6**, **7**) ou aldose D-thréo (**8**) et un groupement R<sub>4</sub> qui correspond à la chaîne latérale d'un acide aminé. Les sondes **3**, **4**, **6**, **7** et **8** n'ont pas été décrites dans la littérature (les sondes **8** et **9** sous forme protégée).

Pour chaque composé nous avons comparé différentes voies de synthèse soit en présence d'enzymes catalysant la formation stéréospécifique de liaison C-C (TK, aldolases) soit par voie chimique (organocatalyse, Sharpless) afin de déterminer les stratégies les plus performantes.

Les sondes **1**, **2**, **3**, **4**, **5** comportant le motif cétose *D-thréo* ont été obtenues en présence de la TK afin de montrer la faisabilité de la réaction (selon la réversibilité de la réaction les sondes pourraient être envisagées comme substrat donneur de la TK). Cependant la sonde **2** a été obtenue avec un très faible rendement certainement en raison sans doute de l'encombrement stérique proche de la fonction aldéhyde du substrat accepteur.

Parmi les deux aldolases testées (FDPA et FSA), la FSA récemment utilisée en synthèse organique s'est révélée la plus efficace pour obtenir les sondes **1**, **3**, **4**, **5** en quantité suffisante pour l'étude du test de sélection montrant le fort potentiel synthétique de cette enzyme. La sonde **2** n'a pas été obtenue en présence de FSA et de FDPA. Ce résultat est en accord avec les faibles vitesses initiales de la FDPA indiquées dans la littérature en présence de cet aldéhyde.

La synthèse des sondes présentant les motifs cétose-L-érythro et aldose *D-thréo* a été envisagée uniquement avec les groupements  $R_4 = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$  et  $R_4 = \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{SCH}_3$ . En effet, compte tenu de l'étude du test de sélection *in vitro* (qui sera décrit dans la partie suivante) en présence de la TK sauvage et aussi des contraintes imposées pour l'obtention de souches auxotrophes pour les acides aminés correspondants, les sondes précurseurs de la leucine  $R_4 = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$  et de la méthionine  $R_4 = \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{SCH}_3$  sont les plus appropriées.

Les sondes cétoles L-érythro **6** ( $R_4 = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ) et **7** ( $R_4 = \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{SCH}_3$ ) ont été obtenues selon une réaction d'aldolisation en présence de L-proline comme catalyseur. La voie de synthèse du composé **7** est originale car cette stratégie n'a pas été décrite à ce jour pour préparer des composés comportant un hétéroatome. Cependant les conditions restent à optimiser.

Pour accéder au motif aldose *D-thréo*, deux stratégies ont été développées l'une basée sur la dihydroxylation asymétrique de Sharpless et l'autre sur la coupure oxydante de la liaison  $\text{C}_1\text{-C}_2$  du cétose *D-thréo* utilisé comme précurseur chiral qui apparaît comme plus facile à mettre en œuvre et la moins coûteuse. Seule, la sonde aldose *D-thréo* **8** ( $R_4 = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ) a été obtenue à partir du cétose **3** *D-thréo*. La stratégie basée sur la coupure oxydante pourrait être adaptée à la synthèse du composé **9** ( $R_4 = \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{SCH}_3$ ) à partir de l'analogue chloré du cétose *D-thréo* **4**.

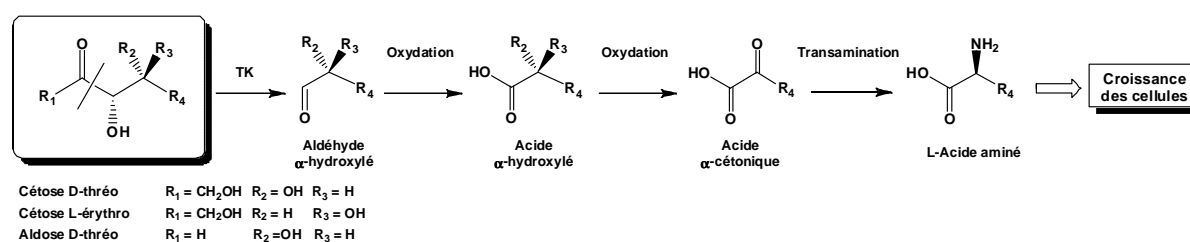


## CHAPITRE II : DEVELOPPEMENT DU TEST DE SELECTION ET INGENIERIE DE LA TRANSCETOLASE

### Introduction

L'organisme proposé pour le développement de ces tests de sélection *in vivo* est la bactérie *Escherichia coli* qui présente plusieurs avantages : le métabolisme de cette bactérie est très bien connu, la plupart des voies de biosynthèse ont été décrites, son génome a été entièrement séquencé et on dispose d'un large arsenal d'outils techniques bien maîtrisés pour modifier ses caractéristiques génétiques.

La stratégie développée en collaboration avec Dr P. Marlière, Dr M. Bouzon et Dr D. Louis (Genoscope-Evry-France) s'appuie sur l'hypothèse que, *in vivo*, les sondes décrites sont transportées à travers les membranes cellulaires, soit par les systèmes de transport des sucres soit par ceux spécifiques des acides aminés, qu'elles sont substrats de la TK et que les aldéhydes  $\alpha$ -hydroxylés libérés sont transformés en l'acide aminé correspondant par une cascade de réactions selon le schéma indiqué ci-après (Figure 179). La formation de l'acide aminé est mise en évidence par la croissance des bactéries qui hébergent la TK et dont la croissance dépend strictement de l'apport de cet acide aminé (bactéries auxotrophes).



**Figure 179 : Principe du test de sélection**

La première étape de cette cascade de réactions dépend de la reconnaissance des sondes comme substrats donneurs par la TK de levure naturelle ou des TK mutées et de la coupure de la liaison C-C. Dans une seconde étape l'aldéhyde  $\alpha$ -hydroxylé est pris en charge par le métabolisme de la cellule hôte pour donner l'acide aminé correspondant selon la cascade réactionnelle proposée dans la Figure 179. Cet acide aminé formé permet la croissance des bactéries.

L'objectif est d'étudier la faisabilité des différentes étapes du test de sélection pour ensuite sélectionner les TK mutées recherchées au sein de la banque en présence des sondes



présentant le motif glycosylé et le groupement  $R_4$  le plus approprié. Une partie de ces travaux (tests *in vivo*) a fait l'objet d'un stage de 6 mois au Genoscope d'Evry.

Dans un premier temps, nous présenterons les résultats obtenus *in vitro* avec les sondes de type cétose D-*thréo* synthétisées (**1**  $R_4 = CH_3$ , **3**  $R_4 = CH_2-CH(CH_3)_2$ , **4**  $R_4 = CH_2-CH_2SCH_3$ , **5**  $R_4 = CH_2OH-CH_3$ ) comportant respectivement les chaînes latérales  $R_4$  de l'alanine, la leucine, la méthionine et la thréonine pour déterminer leur comportement en tant que substrats donneurs de la TK. Nous conforterons ces résultats par des études de docking réalisées par modélisation moléculaire.

Dans un deuxième temps, nous décrirons les expériences de complémentation *in vivo* réalisées avec les sondes identifiées comme les meilleurs substrats donneurs de la TK et avec les intermédiaires de la cascade réactionnelle proposée pour la conversion des sondes en acides aminés.

Dans une troisième partie nous décrirons les stratégies envisagées pour générer les banques de TK mutées qui seront analysées grâce au test de sélection.

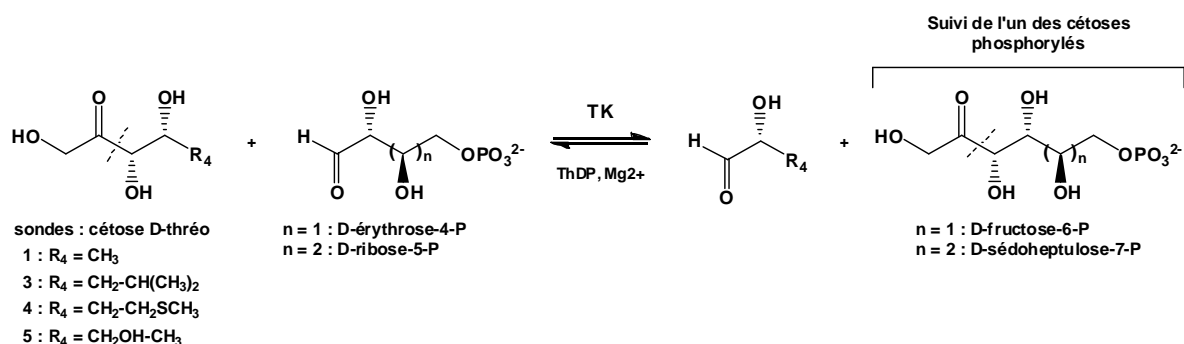
## **1. Etude de la réaction catalysée par la TK de levure en présence des sondes cétooses D-*thréo***

### **1.1. Etude cinétique**

#### **1.1.1. Choix de la méthode d'analyse**

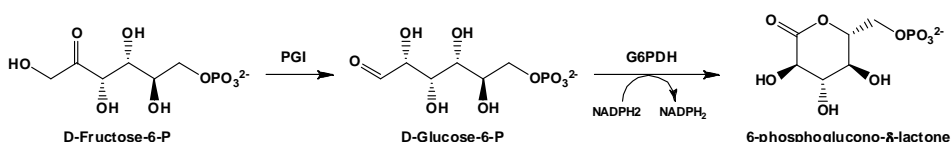
Pour ces études *in vitro*, la TK de levure exprimée dans la levure a été utilisée sous forme d'extrait. Les sondes **1**, **3**, **4** et **5** sont testées comme substrat donneurs en présence de l'un des deux substrats accepteurs naturels commerciaux, le D-ribose-5-P ou le D-érythrose-4-P conduisant respectivement à la formation du D-sédoheptulose-7-P ou du D-fructose-6-P.

Pour déterminer les constantes cinétiques de la TK vis-à-vis des sondes, nous avons envisagé tout d'abord un test multienzymatique spectrophotométrique pour suivre au cours du temps l'apparition de l'un des cétooses phosphorylés formés (D-sédoheptulose-7-P ou du D-fructose-6-P) en présence des quatre sondes testées (Figure 180). Nous avons envisagé de doser le cétose phosphorylé formé afin de développer un test commun à tous les substrats donneurs testés.



**Figure 180 : Réaction catalysée par la TK en présence des sondes (substrats donneurs)**

Le dosage du D-sédoheptulose-7-phosphate fait intervenir la transaldolase qui n'est pas commerciale. Le D-fructose-6-phosphate formé à partir du D-érythrose-4-phosphate (très coûteux) peut être dosé par la phosphoglucosomérase (PGI), qui permet l'isomérisation du D-fructose-6-P formé en D-glucose-6-P qui est ensuite oxydé par la glucose-6-P déshydrogénase (G6PDH) en présence de  $NADP^+$  (Figure 181). Cependant, l'inhibition de la PGI par l'érythrose-4-P ( $K_i = 0,7 \mu M$ ) est décrite dans la littérature<sup>167</sup>.



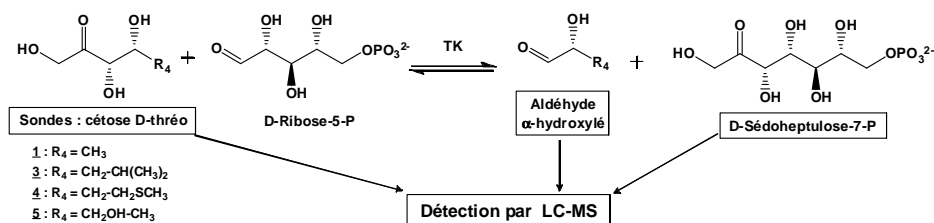
**Figure 181 : Dosage du D-fructose-6-phosphate par la PGI et la G6PDH en présence d'érythrose-4-P**

Les tests spectrophotométriques basés sur le dosage des cétooses phosphorylés semblent difficiles à développer. Nous avons envisagé d'utiliser une méthode chromatographique couplée à la spectrométrie de masse. Cette technique nous permettra de suivre l'apparition du cétoose phosphorylé ainsi que la disparition des sondes et l'apparition des aldéhydes correspondants. Le substrat accepteur naturel utilisé sera le D-ribose-5-phosphate car il est beaucoup moins coûteux que le D-érythrose-4-phosphate.

#### 1.1.1.1. Méthode chromatographique et spectrophotométrique (LC-MS)

##### ➤ Principe

Les substrats donneurs et/ou accepteurs sont analysés à partir de prélèvements effectués au cours du temps dans le milieu réactionnel, par chromatographie sur une phase stationnaire greffée à interactions hydrophiles (Zic<sup>®</sup>- Hilic) et détectés par spectrométrie de masse ionisée en mode électrospray (mode (+) pour les substrats non phosphorylés et mode (-) pour les substrats phosphorylés). Dans ces conditions, aucune enzyme auxiliaire n'est utilisée, la réaction est donc réversible (Figure 182).



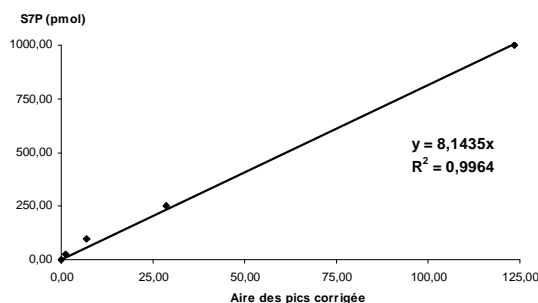
**Figure 182 : Etude de la réaction catalysée par la TK basée sur la détection par LC-MS des substrats et produits**

Le D-sédoheptulose-7-P formé au cours du temps a pu être quantifié et a permis de déterminer des vitesses relatives de la TK en présence des sondes **1**, **3**, **4** et **5**. Des tests qualitatifs ont permis de suivre en parallèle la disparition des substrats **3** et **4** et l'apparition de l'aldéhyde formé à partir de **4**.

### ➤ Conditions réactionnelles

Un tampon volatile, l'acétate d'ammonium ( $\text{AcONH}_4$  50 mM) a été choisi afin d'être compatible avec la technique de spectrométrie de masse utilisée qui implique une étape de vaporisation/ionisation. Le D-ribose-5-P substrat accepteur a été introduit à une concentration de 10 mM ( $K_M = 0,15$  mM). Les sondes **1**, **3**, **4** et **5** ont été utilisées à trois concentrations différentes 3, 10 et 30 mM.

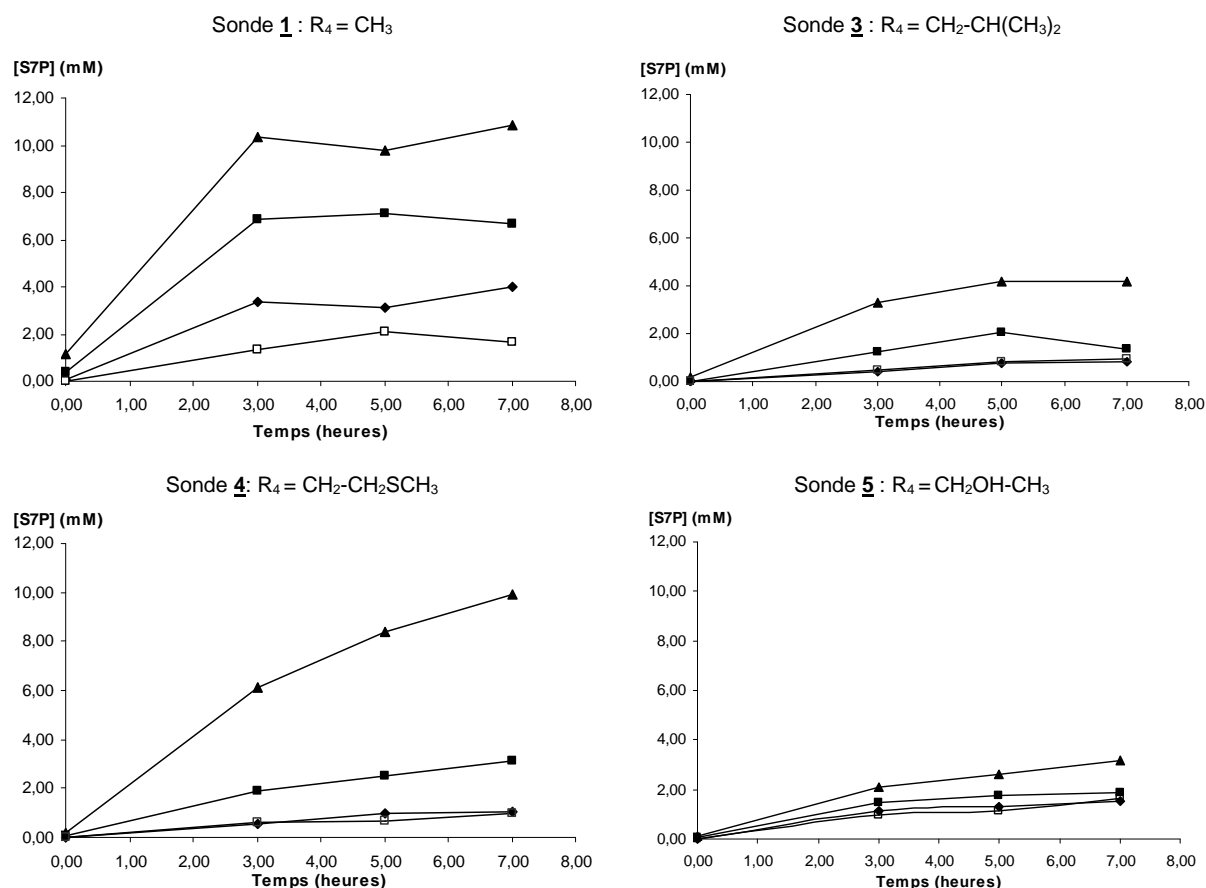
Une droite d'étalonnage du D-sédoheptulose-7-P a été réalisée afin de corrélérer l'aire des pics à la concentration. Une calibration interne reposant sur l'introduction d'une quantité fixe de D-glycérol-3-P a permis de normaliser l'aire des pics. La droite d'étalonnage est linéaire jusqu'à 1000 pmoles avec un bon coefficient de corrélation (Figure 183). Le D-sédoheptulose-7-phosphate est suivi par transition MS-MS, grâce à la formation d'un ion caractéristique du groupement phosphate ( $m/z = 289 \rightarrow 97$ ).



**Figure 183 : Droite d'étalonnage du D-sédoheptulose-7-P réalisée par LC-MS**

➤ Comparaison des sondes 1, 3, 4 et 5 en fonction de la quantité de D-sédoheptulose-7-phosphate formé

En présence des composés **1**, **3**, **4** et **5** à trois concentrations différentes (3, 10 et 30mM), nous avons suivi au cours du temps l'évolution de l'aire du pic correspondant au D-sédoheptulose-7-P formé (Figure 184). Ces concentrations ont été choisies car elles sont proches de celles utilisées pour le test *in vivo*. Pour chaque essai, un témoin sans substrat donneur a également été réalisé.



**Figure 184 : Suivi du D-sédoheptulose-7-P formé en présence des sondes 1, 3, 4 et 5**

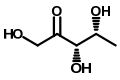
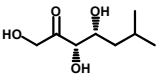
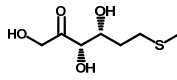
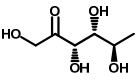
(□ : sans cétose ; ◆ : 3 mM ; ■ : 10 mM ; ▲ : 30 mM)

Il est à noter qu'en l'absence de substrats donneurs et en présence du D-ribose-5-P, nous constatons une apparition du D-sédoheptulose-7-P qui est attribuée à la présence dans l'extrait brut de TK des substrats donneurs naturels (D-xylulose-5-P, D-fructose-6-P). La vitesse de formation du D-sédoheptulose-7-P est alors pratiquement similaire à celles obtenues en présence des plus faibles concentrations en substrats donneurs.

En fonction des quantités de D-sédoheptulose-7-phosphate formées, le composé **1** est le meilleur substrat, vient ensuite le composé **4**, le composé **3** puis le composé **5** (Figure 184).

De plus, d'après les valeurs obtenues pour les quatre sondes testées, les quantités de D-sédoheptulose-7-P formé varient de 0,03 mM à 2,5 mM par heure. La TK étant une transférase, les concentrations obtenues en sédoheptulose-7-P doivent correspondre à celles des aldéhydes formés. Les valeurs obtenues seraient compatibles avec l'utilisation des sondes dans le milieu de culture de *E. coli*. Les concentrations minimales en acides aminés naturels pour la croissance de souches auxotrophes sont en effet de l'ordre de 0,1 à 0,3 mM.

D'après les résultats obtenus entre 0 et 3 heures, nous avons pu calculer les vitesses d'appropriation du D-sédoheptulose-7-phosphate de la TK (des mesures entre 0 et 3 heures permettraient d'affiner les résultats) en présence des composés **1**, **3**, **4** et **5** (Tableau 26).

Concentration des composés	Vitesse initiale : $\mu\text{mole de sédoheptulose-7-P formé.mL}^{-1} . \text{min}^{-1}$			
	Composé <b>1</b> 	Composé <b>3</b> 	Composé <b>4</b> 	Composé <b>5</b> 
3 mM	0,011	0,0005	0,001	0,0005
10 mM	0,028	0,004	0,007	0,002
30 mM	0,043	0,014	0,029	0,005

**Tableau 26 : Vitesses initiales de formation du D-sédoheptulose-7-P en présence des composés **1**, **3**, **4** et **5** et du D-ribose-5-P**

En présence des quatre composés testés à une concentration de 3 mM, les vitesses sont très faibles (déduction faite du bruit de fond observé en l'absence de substrat donneur).

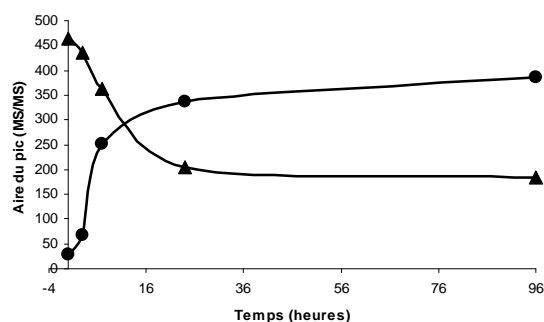
Pour des concentrations de 10 et 30 mM, le composé **1** ( $R_4 = \text{CH}_3$ ) conduit aux vitesses les plus élevées (de 0,011 à 0,043  $\mu\text{mole.mL}^{-1} . \text{min}^{-1}$ ).

Pour une concentration de 10 mM, le composé **4** (0,007  $\mu\text{mole.mL}^{-1} . \text{min}^{-1}$ ) conduit à une vitesse environ deux fois supérieure à celle obtenue avec le composé **3** (0,004  $\mu\text{mole.mL}^{-1} . \text{min}^{-1}$ ) et trois fois supérieure à celle obtenue avec le composé **5** (0,002  $\mu\text{mole.mL}^{-1} . \text{min}^{-1}$ ). Ces facteurs entre les vitesses initiales des composés **3** (0,014  $\mu\text{mole.mL}^{-1} . \text{min}^{-1}$ ) et **4** (0,029  $\mu\text{mole.mL}^{-1} . \text{min}^{-1}$ ) sont encore observables à une concentration de 30 mM.

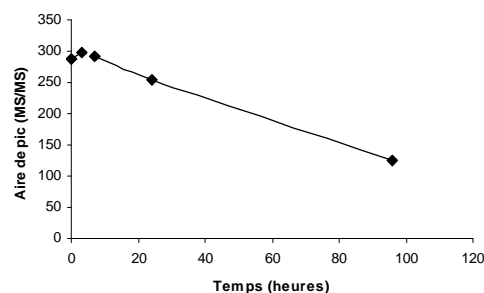
➤ Etude de la réaction basée sur la disparition des composés **3** et **4** et l'apparition des aldéhydes correspondant

Nous avons voulu également corréler la quantité de D-sédoheptulose formé avec la disparition des sondes et l'apparition de l'aldéhyde  $\alpha$ -hydroxylé. Ces expériences ont été réalisées dans le cas des sondes **3** (10mM) et **4** (10mM). Le composé **3** a été détecté d'après l'aire du pic à  $m/z = 175$   $[\text{M-H}]^-$ . D'après des expériences MS-MS, les composés **4** et **29**

(aldéhyde  $\alpha$ -hydroxylés) ont donné respectivement les ions fils  $m/z = 129$  et pour  $m/z = 117$ . Les résultats obtenus ne sont pas quantitatifs dans la mesure où nous n'avons pas réalisé des courbes d'étalonnage comme dans le cas du D-sédoheptulose-7-P. Nous constatons bien la disparition du composé **4** et parallèlement l'apparition d'un pic correspondant à l'aldéhyde attendu. L'équilibre semble atteint après 100 heures de réaction (Figure 186).



**Figure 186 : Suivi du composé **4** et de l'aldéhyde correspondant par LC-MS**



**Figure 187 : Suivi du composé **3** par LC-MS**

Nous avons également suivi la disparition du substrat **3** (10mM), l'aldéhyde formé n'étant pas détectable par la méthode ES. L'apparition du sédoheptulose-7-P montré précédemment peut être corrélée à la disparition du composé **3** (Figure 187).

### ➤ Conclusion

D'après cette étude nous pouvons classer les quatre composés testés (**1** > **4** > **3** > **5**) en fonction des vitesses de formation du D-sédoheptulose. Des études plus approfondies avec une gamme de concentration plus étendue nous permettront de déterminer les valeurs de  $V_M$  et de  $K_M$ .

Le composé **1** est le meilleur substrat donneur parmi les quatre testés. Le groupement  $R_4$  est dans ce cas un groupement méthyle ne conduisant à aucune contrainte au niveau du site actif de la TK et pour cette raison permet certainement un meilleur positionnement du groupe carbonyle du substrat par rapport au ThDP comparativement aux autres composés.

Dans le cas du composé **4** ( $R_4 = \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{SCH}_3$ ) la chaîne linéaire comportant un hétéroatome à un effet plus favorable sur la vitesse de la réaction par rapport au composé **3** ( $R_4 = \text{CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$ ) dont l'encombrement stérique peut sans doute gêner l'attaque du groupe carbonyle. De plus, nous avons mis en évidence la disparition des composés **3** et **4** et la formation de l'aldéhyde dans le cas du composé **3**.

Les faibles valeurs obtenues en présence du composé **5** ( $R_4 = \text{CH}_2\text{OH-CH}_3$ ) pourraient s'expliquer par la structure cyclique de ce substrat par rapport aux autres composés linéaires.

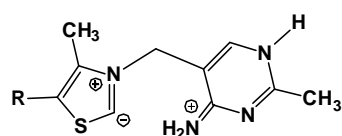
## 1.2. Etude par modélisation moléculaire des interactions entre les sondes 1, 3 4, 5 et les résidus du site actif de la TK

Cette étude a été réalisée en collaboration avec Vincent Théry et Lionel Nauton du Laboratoire SEESIB. L'objectif est ici de comparer les interactions TK/substrat donneurs naturels avec celles qui pourraient s'établir avec les nouveaux substrats donneurs **1**, **3**, **4**, et **5**.

Le logiciel utilisé pour cette étude est Autodock, ainsi que l'outil graphique ADT, permettant de générer les fichiers d'entrée. La TK utilisée lors des calculs, est la structure de *S. cerevisiae* issue de la PDB (1TRK). Cependant nous ne disposons pas de la structure de cette enzyme en présence de substrat donneur. Seule la TK de *E. coli* a été cristallisée depuis peu avec le D-xylulose-5-P. Les sites actifs étant semblables, nous avons utilisé ces données cristallographiques pour développer notre étude de docking.

Pour les calculs de docking l'ensemble de la protéine est considérée mais la carte de potentiel n'est calculée que sur la surface définie par les acides aminés du site actif. Les molécules d'eau n'intervenant pas dans les calculs de docking, elles n'ont pas été considérées. Le résidu Arg359 du site actif qui interagit avec le groupement phosphate du D-xylulose-5-P *via* une molécule d'eau n'a donc pas été retenu. Pour compléter le modèle, l'état de protonation du site actif est indiqué dans le Tableau 27. L'état ionique des différents résidus a été défini par comparaison des résultats de minimisation des différentes combinaisons de protonation possibles avec les données cristallographiques.

Résidu	Charge
His30	0
His103	0
His263	+1
His481	+1
His469	+1
Asp477	-1
Arg 528	+1



ThDP sous forme carbanion

Tableau 27 : Etat de protonation des résidus du site actif et état du ThDP

Le site actif tel qu'il est défini sera maintenu dans une forme fixe lors des calculs car l'objectif dans un premier temps est simplement de montrer que les interactions enzyme/substrat sont possibles. La forme initiale des ligands est établie d'après la structure du D-xylulose-5-phosphate dans le site actif de la TK de *E. coli* (Figure 188).

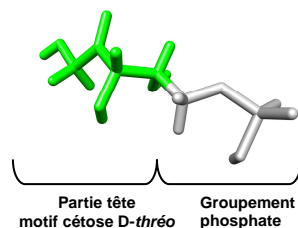


Figure 188 : Conformation du D-xylulose-5-P

La partie indiquée en vert dans la Figure 185 correspond à la tête des ligands dont la chaîne carbonée restera fixe pour tous les composés. Les atomes d'hydrogène des groupes hydroxyles en C3 et C4, gardent leur libre rotation pour s'ajuster au mieux au site. La partie bleue (R<sub>4</sub>) sera quant à elle sans contraintes.

Pour chaque modèle les conditions de docking sont identiques (le nombre de cycle, le nombre de population par cycle ainsi que les autres paramètres de docking). La seule variante d'un composé à l'autre est le nombre de libres rotations qui est lié à la longueur des chaînes carbonées des différents groupements R<sub>4</sub>. Cette étude nous a permis notamment de quantifier l'énergie libre de liaison  $\Delta G$

$$\Delta G = V_L + V_P + V_{P/L \text{ lié}} + V_{P,L \text{ non lié}} + \Delta S$$

Formule de calcul de l'énergie de liaison  $\Delta G$

(V : potentiel ;  $\Delta S$  : variation d'entropie due à la conformation)

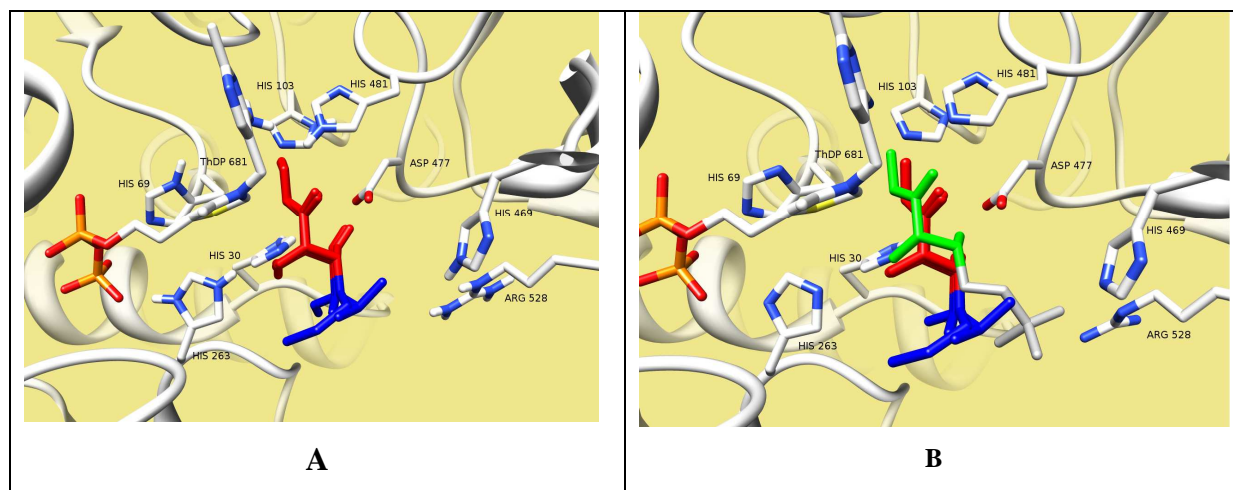
V tient compte du potentiel de type Van der Waals, du potentiel spécifique pour représenter les liaisons hydrogène, du potentiel électrostatique et du potentiel de désolvatation.

Ligand		Energie libre de liaison ( $\Delta G$ )
D-Xylulose-5-P		-2.93 kcal/mol
L-Erythrulose		-2,26 kcal/mol
Cétose <u>1</u>		-2.54 kcal/mol
Cétose <u>3</u>		-3.07 kcal/mol
Cétose <u>4</u>		-2.88 kcal/mol
Cétose <u>5</u>		-2.22 kcal/mol

Tableau 28 : Energie libre de liaison pour les différents composés étudiés



Les valeurs négatives des énergies libres de liaison obtenues sont toutes très proches de celles obtenues avec le D-xylulose-5-P. Les composés **1**, **3**, **4** et **5** présentent tous la possibilité de conduire à des interactions avec le site actif de la TK, et de s'adapter à celui-ci comme le montre la Figure 189 dans laquelle l'ensemble des composés sont superposés les uns aux autres (Figure 189 A) et avec le D-xylulose-5-P (Figure 189 B).



**Figure 189 : Superposition des ligands : (A) composés **1**, **3**, **4**, **5** et L-érythrulose en rouge et bleu (B) avec le D-xylulose -5-P (en vert et gris)**

Il est à noter un léger décalage des composés **1**, **3**, **4** et **5** et du L-érythrulose avec le D-xylulose-5-P, substrat naturel qui est induit par l'interaction du groupement phosphate avec l'Arg528 (Figure 189 B).

Ces résultats montrent que les groupements R<sub>4</sub> des sondes ne gênent pas la reconnaissance et le positionnement de la tête hydroxylée par les résidus qui stabilisent le substrat naturel. La réaction catalytique est donc possible en présence de ces différents substrats.

Une étude de minimisation est en cours en présence de ces différents composés dans le but d'affiner les interactions site actif/substrat est ainsi de comparer leur affinité.

### **1.3. Conclusion**

Les études réalisées *in vitro* montrent que les composés **1**, **3**, **4** et **5** sont des substrats donneurs pour la TK de levure capables de libérer l'aldéhyde  $\alpha$ -hydroxylé correspondant. Les études cinétiques ont été réalisées par LC-MS et ont permis de comparer les composés testés en fonction des vitesses de formation du D-sédoheptulose-7-phosphate obtenues en présence de TK de levure. Le composé **1** (R<sub>4</sub> = CH<sub>3</sub>) conduit à des vitesses initiales les plus élevées

ensuite le composé **4** ( $R_4 = \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{SCH}_3$ ) puis le composé **3** ( $R_4 = \text{CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$ ), et enfin le composé **5** ( $R_4 = \text{CH}_2\text{OH-CH}_3$ ). L'absence de contrainte du groupement  $R_4$  du composé **1** au niveau du site actif semble favoriser le positionnement de la « tête » cétose *D-thréo* de ce composé et donc le mécanisme catalytique. Une chaîne carbonée plus longue (composé **3**) et ramifiée (composés **4** et **5**) conduit à des vitesses initiales inférieures. L'encombrement stérique du groupe  $R_4$  du composé **3** semble moins favorable que la présence d'une chaîne linéaire comportant un hétéroatome (composé **4**). Le composé (**5**) qui est sous forme cyclique conduit à des vitesses encore plus faibles.

Une étude par modélisation moléculaire a permis de confirmer la formation des complexes enzyme/substrat. Une étude plus approfondie par minimisation nous permettra de comparer l'affinité des substrats pour la TK.

Notre objectif a été ensuite de tester ces nouveaux substrats donneurs de la TK en mettant à profit la nature des groupements  $R_4$  pour accéder *in vivo* dans une cellule hôte appropriée aux acides aminés correspondants. Cette stratégie pourrait être utilisée pour le développement d'un test de sélection de TK.

## **2. Etude *in vivo* du test de sélection**

Au vu des résultats obtenus lors des synthèses et de l'étude *in vitro* de l'activité de la TK sur les cétooses *D-thréo*, le composé **1** est de toute évidence le meilleur substrat de la TK. Mais l'utilisation de ce composé dans un test *in vivo* de criblage par complémentation n'est pas envisageable car il est très difficile d'obtenir des mutants de *E. coli* auxotrophes pour l'alanine. En effet, l'alanine est générée *in vivo* par transamination du pyruvate et plusieurs aminotransférases à spécificité large sont susceptibles de catalyser cette réaction. Supprimer le précurseur direct de l'alanine, le pyruvate, qui est impliqué dans de nombreuses voies métaboliques centrales chez *E. coli* ne peut être obtenu qu'au prix de remaniements importants du métabolisme cellulaire et d'une forte réduction de la croissance des bactéries (Figure 190).

Nous avons donc décidé d'étudier les composés **3** et **4**, c'est-à-dire les cétooses *D-thréo* présentant la chaîne latérale de la leucine ou de la méthionine. La première étape pour la mise en place des tests de sélection consiste à construire des souches de *E. coli* auxotrophes pour la leucine ou la méthionine.

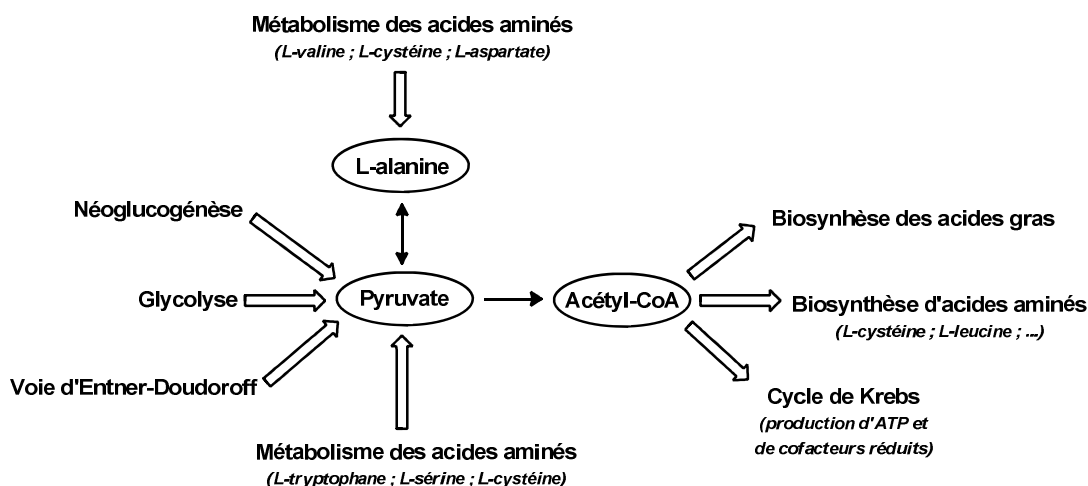


Figure 190: Principales voies métaboliques impliquant le pyruvate et l'alanine chez *E. coli*

## 2.1. Obtention des cellules auxotrophes pour la leucine et la méthionine

### 2.1.1. Voies métaboliques de biosynthèse de la leucine et de la méthionine

Chez *E. coli*, la leucine est synthétisée à partir du 2-oxo-isovalérate en 4 étapes (Figure 191). Les enzymes qui catalysent les 3 premières étapes sont codées par les gènes *leuA*, *leuB*, *leuC* et *leuD* qui sont regroupés sur le chromosome dans un opéron (*leuABCD*). Les intermédiaires de cette voie de biosynthèse ne peuvent être obtenus par aucune autre réaction, ni à partir d'autres précurseurs. Des bactéries *E. coli* auxotrophes pour la leucine seront donc aisées à obtenir, par blocage de l'une ou l'autre étape de la voie de biosynthèse.

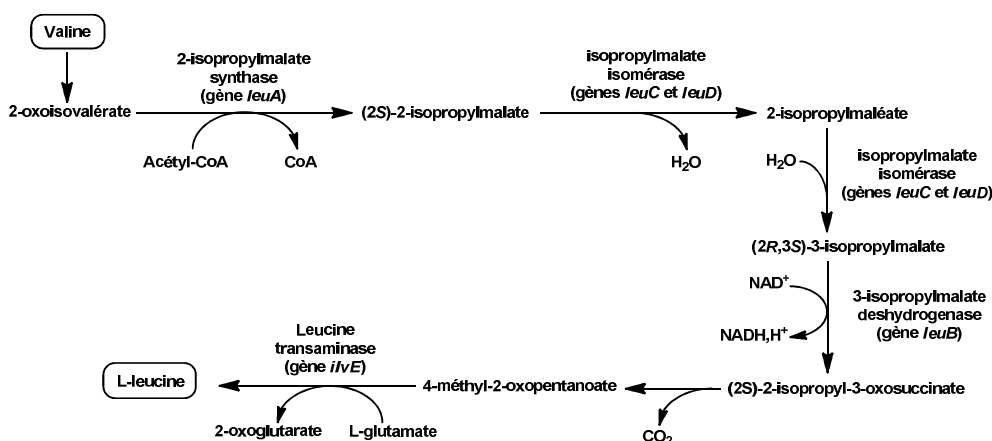


Figure 191 : Voie de biosynthèse de la leucine chez *E. coli* (Source : *Ecocyc*)

La méthionine est synthétisée à partir de L-homosérine, de L-cystéine et du transfert d'un groupement méthyle en 4 étapes catalysées par les enzymes MetA, MetB, MetC et MetE ou MetH. Les gènes codant pour ces enzymes ne sont pas regroupés en opéron mais sont au contraire dispersés sur le chromosome. Comme pour la leucine, la voie de biosynthèse de la

méthionine est unique et incontournable. Des auxotrophes pour la méthionine seront faciles à obtenir par blocage de l'un ou l'autre des étapes (Figure 192).

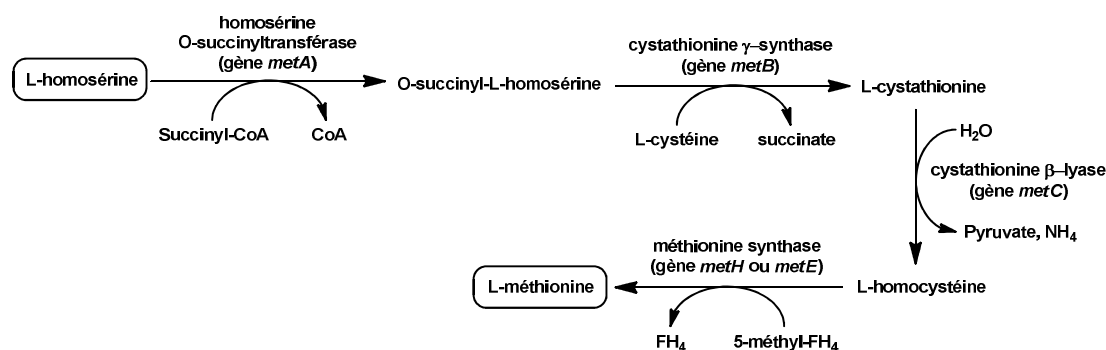


Figure 192 : Voie de biosynthèse de la méthionine chez *E. coli* (Source: Ecocyc)

### 2.1.2. Construction de souches de *E. coli* auxotrophes

Les souches auxotrophes pour la leucine ou la méthionine ont été construites par l'équipe du Genoscope à partir de la souche de *E. coli* K12 MG1655. Les délétions de gènes ont été obtenues par la méthode décrite par Datsenko et Wanner<sup>168</sup>. Cette méthode permet de substituer par recombinaison homologue le gène chromosomique par un gène de résistance à un antibiotique. Les bactéries dans lesquelles la recombinaison a effectivement eu lieu sont sélectionnées en présence de l'antibiotique.

L'opéron *leuABCD* a été substitué par une cassette de résistance à la kanamycine (gène *kan*). La suppression de cet opéron a été vérifiée par un test phénotypique : les bactéries résistantes à la kanamycine sont incapables de croître en milieu minimum (MS glc 0,2 %) et dépendent strictement de l'apport de leucine dans le milieu de culture (MS glc 0,2 % leucine 0,3 mM).

Le gène *metA* a été substitué par une cassette de résistance au chloramphénicol (gène *cat*) ou à la spectinomycine (gène *aad*). Le phénotype auxotrophe des bactéries résistantes aux antibiotiques a été vérifié *in vivo* : les bactéries résistantes sont incapables de croître en milieu minimum (MS glc 0,2 %) et dépendent strictement de l'apport de méthionine dans le milieu de culture (MS glc 0,2 % méthionine 0,3 mM).

## 2.2. Etude de croissance en présence des précurseurs des acides aminés

Nous avons vérifié l'hypothèse de la formation *in vivo* de la méthionine et de la leucine à partir de l'aldéhyde correspondant généré par la TK par la cascade réactionnelle supposée. Nous avons donc étudié la croissance des souches de *E. coli* auxotrophes en présence de chaque intermédiaire, acide α-cétonique, acide α-hydroxylé et aldéhyde α-hydroxylé (Figure 193).

Il faut remarquer que contrairement au cas de la leucine, le 2-oxo-acide correspondant à la méthionine (2-oxo-4-methylthiobutyrate) n'est pas un intermédiaire de la voie de biosynthèse de la méthionine. Cependant, il est décrit que plusieurs transaminases catalysent la transamination de la méthionine (aspartate aminotransférase, tyrosine aminotransférase) (*Escherichia coli* et *Salmonella*<sup>169</sup>).

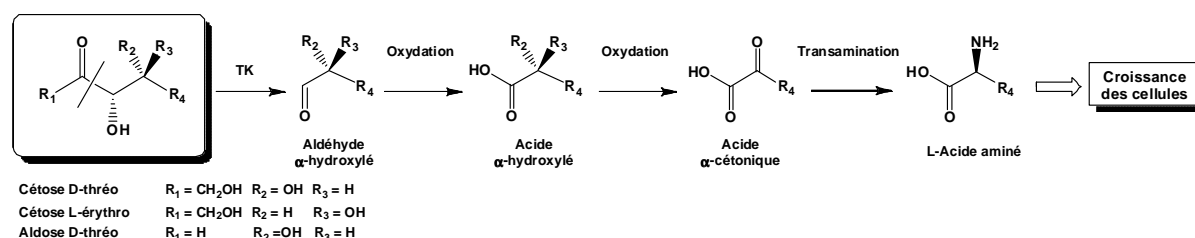


Figure 193: Principe du test de sélection

Pour caractériser la croissance des souches de *E. coli* nous avons mesuré le temps de génération G (temps nécessaire au doublement de la population bactérienne) qui rend compte de la quantité de cellules obtenues pendant la phase exponentielle de croissance. Le suivi de la croissance de *E. coli* a été effectué par mesure de l'absorbance à 600 nm (Figure 194).

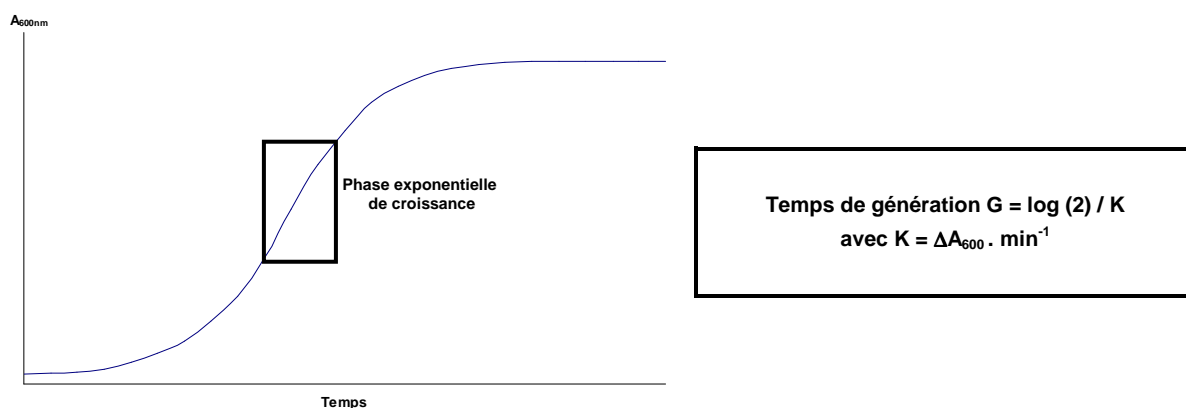


Figure 194 : Profil d'une croissance bactérienne et calcul du temps de génération G

Les souches G554 (auxotrophe leucine) et +2231 (auxotrophe méthionine) ont été cultivées en milieu salin minimum (MS) en présence de glucose comme source de carbone supplémenté respectivement en leucine ou méthionine ou en composés précurseurs de ces deux acides aminés.

Les concentrations utilisées pour ces études sont de 0,3 mM en acides aminés. Pour les précurseurs (aléhydes  $\alpha$ -hydroxylés, hydroxy et cétoacides) les études ont été faites à 0,1 ; 0,3 et 3mM. Pour les sondes **3** et **4** des concentrations de 0,3 ; 1 et 3mM ont été testées. Les concentrations de 3 mM ont conduit aux meilleurs résultats. Les courbes de croissance obtenues en présence de tous ces composés sont données en annexe (Annexes 7 à 14).

### 2.2.1. Croissance en présence des aldéhydes $\alpha$ -hydroxylés

Nous avons étudié la croissance des souches auxotrophe G554 et +2231 en présence des acides  $\alpha$ -hydroxylés (*R*) et (*S*) **29** et **34** (dont les synthèses ont été développées dans la partie précédente) précurseurs respectivement de la leucine et de la méthionine (Tableau 29).

	Souche G554 ( $\Delta leuABCD$ )				Souche +2231 ( $\Delta metA$ )			
	Sans apport	L-leucine 0,3 mM	Composé ( <i>R</i> )- <b>29</b> 0,3 mM	Composé ( <i>S</i> )- <b>29</b> 0,3 mM	Sans apport	L-méthionine 0,3 mM	Composé ( <i>R</i> )- <b>34</b> 0,3 mM	Composé ( <i>S</i> )- <b>34</b> 0,3 mM
G	NG	7 h	79 h	100 h	NG	2h45	11h40	32h30

**Tableau 29: Croissance des souches auxotrophes en présence d'aldéhyde  $\alpha$ -hydroxylés (Annexes 7 et 8)**  
(NG : pas de croissance)

Nous constatons que la croissance est globalement plus lente en présence de la leucine et de ses précurseurs aldéhydiques qu'en présence de méthionine pour la même concentration. Cependant pour les souches G554 et +2231 nous constatons une complémentation de leur auxotrophie par les aldéhydes  $\alpha$ -hydroxylés (*R*)-**29** et (*S*)-**29** et (*R*)-**34** et (*S*)-**34**. Il est à noter une croissance plus lente en présence des énantiomères (*S*). Cependant, ce résultat est tout de même intéressant car il sera donc envisageable d'utiliser les sondes présentant le motif cétose L-érythro précurseur des aldéhydes  $\alpha$ -hydroxylés (*S*) dans le cadre du criblage des banques de TK mutées.

### 2.2.2. Croissance en présence des acides $\alpha$ -hydroxylés

Nous avons étudié la croissance des souches auxotrophe G554 et +2231 en présence des acides  $\alpha$ -hydroxylés (*R*)-**25** et *rac*-**31** (nous n'avons pas pu synthétiser le composé **31** optiquement pur et seul le mélange racémique est commercial) précurseurs respectivement de la leucine et de la méthionine (Tableau 30).

	Souche G554 ( $\Delta leuABCD$ )				Souche +2231 ( $\Delta metA$ )		
	Sans apport	L-leucine 0,3 mM	Composé ( <i>R</i> )- <b>25</b> 0,3 mM	Composé ( <i>S</i> )- <b>25</b> 0,3 mM	Sans apport	L-méthionine 0,3 mM	Composé <i>rac</i> - <b>31</b> 0,3 mM
G	NG	7 h	7h30	8 h	NG	2h45	2h40

**Tableau 30 : Croissance des souches auxotrophes en présence d'acides  $\alpha$ -hydroxylés (Annexes 9 et 10)**  
(NG : pas de croissance)

Les temps de génération des souches G554 et +2231 en présence des acides  $\alpha$ -hydroxylés (*R*)-**25**, (*S*)-**25** et *rac*-**31** sont quasiment identiques aux temps de génération

observés en présence des acides aminés pour la même concentration. Le métabolisme de *E. coli* semble donc bien adapté à la conversion des acides  $\alpha$ -hydroxylés en acides aminés correspondant.

Cette étape au cours de laquelle la chiralité est perdue (selon notre schéma la fonction alcool du carbone asymétrique en position  $\alpha$  de l'aldéhyde est oxydée en fonction cétone) permettra d'utiliser des sondes de type cétose présentant la configuration *S* au niveau du carbone 4. Les acides  $\alpha$ -hydroxylés (*S*) libérés seront donc convertis en L-acide aminé.

### 2.2.3. Croissance en présence des acides $\alpha$ -cétoniques

Les acides  $\alpha$ -hydroxylés (*R*) ou (*S*) testés précédemment pourraient subir une oxydation en acides  $\alpha$ -cétoniques correspondants (acide  $\alpha$ -céto-isocaproïque et acide  $\alpha$ -céto-3-(méthylthio)butyrique). La croissance des souches auxotrophes G554 et +2231 en présence de ces acides a donc été réalisée (Tableau 31).

	Souche G554 ( $\Delta leuABCD$ )			Souche +2231 ( $\Delta metA$ )		
	Sans apport	L-leucine 0,3 mM	Acide $\alpha$ -céto-isocaproïque 0,3 mM	Sans apport	L-méthionine 0,3 mM	Acide $\alpha$ -céto-3-(méthylthio)butyrique 0,3 mM
G	NG	7 h	6 h	NG	2h45	2h35

**Tableau 31 : Croissance des souches auxotrophes en présence d'aldéhyde  $\alpha$ -cétoniques (Annexes 9 et 10)**  
(NG : pas de croissance)

Nous avons observé des temps de génération comparables à ceux obtenus en présence des acides aminés présents à la même concentration. Le métabolisme de *E. coli* permet la conversion de l'acide  $\alpha$ -cétoisocaproïque et de l'acide  $\alpha$ -céto-3-(méthylthio)butyrique en L-acide aminé correspondant par transamination.

### 2.2.4. Conclusion

Les résultats des études de croissance des souches auxotrophes en présence des intermédiaires proposés dans la cascade réactionnelle montrent que chacun d'entre eux est capable de compléter les cellules auxotrophes et de conduire à leur croissance. L'étape limitante semble être la conversion des aldéhydes  $\alpha$ -hydroxylés en acides correspondants. L'enzyme responsable de cette oxydation doit donc avoir un spectre d'activité plus restreint que les autres enzymes de la cascade. L'autre aspect à prendre en compte concerne le transport membranaire des différents substrats testés. Les acides  $\alpha$ -hydroxylés et les acides  $\alpha$ -

cétoniques conduisent à des taux de croissance analogues à ceux obtenus avec les acides aminés (leucine et méthionine). Ces résultats valident le schéma de la cascade réactionnelle menant de l'aldéhyde  $\alpha$ -hydroxylé à l'acide aminé.

## **2.3. Etude de croissance en présence des sondes cétose D-thréo 3 et 4**

### **2.3.1. Contextes d'expression de la TK de *S. cerevisiae* dans *E. coli***

Le gène TKL1 a été introduit dans deux vecteurs appartenant à des groupes d'incompatibilité distincts qui sont maintenus dans les lignées cellulaires à des nombres de copies différents :

- le plasmide pDRI5 (bla+ **TKL1**+) est dérivé du vecteur pUC18, vecteur maintenu à un nombre élevé de copies par cellule
- le plasmide pGEN377 (cat+ **TKL1**+) est dérivé du vecteur pSU18 maintenu à un faible nombre de copies par cellule.

L'expression du gène TKL1 doit être suffisante pour suppléer l'absence des TK endogènes et permettre la production des précurseurs des acides aminés nécessaires à la croissance cellulaire en présence des sondes. Par ailleurs, cette expression ne doit pas être trop élevée car il est décrit que l'expression de certains gènes hétérologues peut être toxique dans *E. coli*.

Pour vérifier la fonctionnalité de la TK de levure (TKL1) exprimée dans *E. coli*, les plasmides pDRI5 et pGEN377 contenant le gène TKL1 ont été introduits par transformation dans des bactéries de la souche G91 dépourvue des gènes *tktA* et *tktB* codant pour les deux transcétolases endogènes.

Pour déterminer l'activité *in vivo* de la TK de levure (TKL1) sur les sondes cétose D-thréo **3** et **4**, le gène TKL1 a été cloné dans des plasmides et exprimé dans des souches de *E. coli* auxotrophes pour la méthionine ( $\Delta metA$ ) ou la leucine ( $\Delta leuABCD$ ) et dépourvues des gènes *tktA* et *tktB* codant pour les transcétolases endogènes. Les contextes adéquats ont été obtenus par transformation des souches G678 ( $\Delta tktA \Delta tktB \Delta leuABCD$ ) et G1146 ( $\Delta tktA \Delta tktB \Delta metA$ ) par les plasmides pDRI5 et pGEN377

Pour la mise au point du test de sélection en présence des sondes **3** et **4** les souches hôtes de *E. coli* (G1242, G1074, G1242 et G1073) n'expriment donc pas la TK chromosomique de *E. coli* ( $\Delta tktA \Delta tktB$ ) car il est indispensable que la seule source de TK



proviennent uniquement du gène TKL1 cloné dans le plasmide que nous introduirons dans la souche auxotrophe, ceci afin de montrer que la survie cellulaire est spécifique de la TK. (Tableau 32).

Plasmide		<i>E. coli</i> auxotrophes pour la méthionine		<i>E. coli</i> auxotrophes pour la leucine	
		Souche	Génotype	Souche	Génotype
<b>Plasmide pUC</b> (« <i>high-copy</i> »)	pDRI5 (TKL1+)	G1242	$\Delta tktA \Delta tktB$	G1074	$\Delta tktA \Delta tktB$
	pSP100 (vecteur vide)	G1241	$\Delta metA$	G1073	$\Delta leuABCD$
<b>Plasmide pSU</b> (« <i>low-copy</i> »)	pGEN377 (TKL1+)	G1984	$\Delta tktA \Delta tktB$	G1983	$\Delta tktA \Delta tktB$
	pVDM18 (vecteur vide)	G1980	$\Delta metA$	G1979	$\Delta leuABCD$

**Tableau 32 : Ensemble des contextes d'auxotrophie et d'expression de la TK utilisés**

### **2.3.2. Etude de la croissance des souches en présence des sondes 3 et 4**

#### **2.3.2.1. Composition des milieux de cultures**

Un milieu salin minimum (MS) a été utilisé en présence de glucose comme source de carbone. Pour les souches présentant un génotype  $\Delta tktA \Delta tktB$  et transformées avec un plasmide vide, le milieu de culture a été complété avec les éléments nécessaires à la croissance des cellules, c'est-à-dire l'acide shikimique (Shi), la pyridoxine (B6), le tryptophane, la phénylalanine et la tyrosine (Aro).

Comme pour les études précédentes nous avons caractérisé la croissance des souches de *E. coli* par la détermination du temps de génération G d'après les courbes de croissance.

#### **2.3.2.2. Efficacité de la TK de *S. cerevisiae* exprimée dans *E. coli***

Afin de vérifier si la TK de levure est bien fonctionnelle dans *E. coli* nous avons comparé les temps de génération des souches MG1655 (sauvage), G91 ( $\Delta tktA \Delta tktB$ ) et G391 ( $\Delta tktA \Delta tktB$  pDRI5 (TKL1+)). Conformément à ce que nous attendions dans les conditions de culture indiquées ci-dessous (Tableau 33), la souche G91 ne croît en milieu minimum MS avec le glucose comme source de carbone qu'en présence des compléments aromatiques (ARO, shi) et de pyridoxine (B6). L'utilisation du ribose comme source de carbone est dépendante de l'expression de la TK et permet un flux de carbone moins important que le glucose. En effet, le ribose ne permet pas la croissance de la souche G91, même en présence des compléments (ARO Shi B6) et conduit chez la souche MG1655 à des temps de génération 6 fois plus importants que ceux obtenus en présence de glucose.

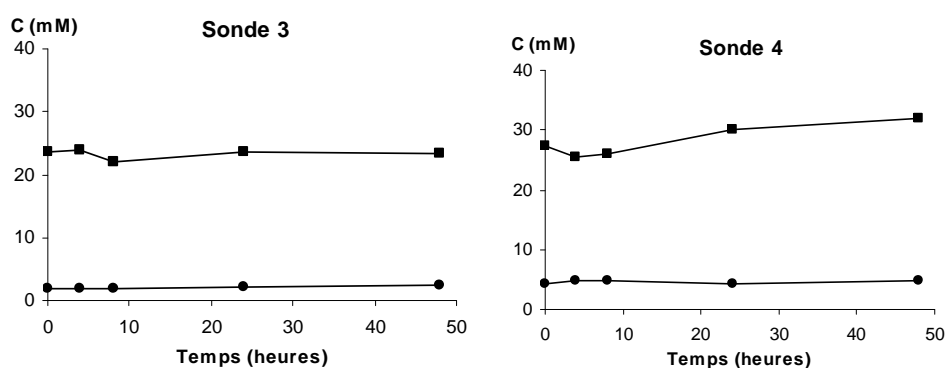
Génotype	Temps de génération (G)			
	MS Glucose	MS Glucose Aro Shi B6	MS Ribose	MS Ribose Aro Shi B6
MG1655 Sauvage <i>tktA tktB</i>	4h00	3h35	22h40	22h40
G91 $\Delta tktA \Delta tktB$	NG	7h20	NG	NG
G391 $\Delta tktA \Delta tktB$ pPUC : pDRI5 (+TKL1)	4h20	4h20	30h50	28h40

**Tableau 33 : Croissance des souches *E. coli* en fonction de la présence ou de l'absence du gène de la TK de levure et des gènes *tktA* et *tktB* de *E. coli***

Les bactéries de la souche G391, qui expriment le gène TKL1, ont le même phénotype que la souche sauvage MG1655 exprimant *tktA* et *tktB* endogènes. La TK de levure exprimée à partir d'un plasmide est donc fonctionnelle chez *E. coli*.

#### 2.3.2.3. Etude de stabilité des sondes **3** et **4**

Avant d'effectuer les études de croissance des différentes souches en présence des sondes **3** et **4**, nous avons vérifié la stabilité de ces composés dans le milieu minéral minimal (milieu MS) dans les conditions de milieu, température et pH prévues pour les tests de croissance sur une période de 48 heures (Figure 195). La stabilité a été étudiée par l'analyse de spectres  $^1\text{H}$  RMN effectués au cours du temps. Les concentrations ont été déterminées par comparaison des intégrations de signaux caractéristiques (les groupements méthyles terminaux des chaînes latérales des sondes **3** et **4**) par rapport à un étalon interne. La N,N-diméthylformamide (DMF) a été choisie comme étalon interne, car son spectre  $^1\text{H}$  RMN se distingue facilement des spectres  $^1\text{H}$  RMN des sondes **3** et **4**.



**Figure 195 : Etude de stabilité des sondes **3** et **4** dans le milieu MS (■ : 30 mM ; ● : 3 mM)**

A l'issue de cette étude, nous avons montré que les sondes **3** et **4** étaient stables dans le milieu de culture minimal utilisé pour les études de croissance des souches auxotrophes.

#### 2.3.2.4. Utilisation de la sonde **3** comme précurseur de la leucine

Comme indiqué précédemment, la croissance optimale (parmi les 3 concentrations testées 0,3 ; 1 et 3 mM) a été obtenue pour une concentration de 3 mM (courbes en Annexe 11). En présence du plasmide pUC, la souche G1074 qui exprime le gène TKL1 est bien capable de se développer mais avec un temps de génération 20 fois plus élevé qu'en présence de leucine (Tableau 34). Ceci peut être expliqué par plusieurs facteurs : (1) le fait que la sonde **3** est un pauvre substrat de la TK de levure comme le suggère les mesures in vitro de la vitesse initiale de réaction (2) la cinétique de transformation de l'aldéhyde  $\alpha$ -hydroxylé par la cascade réactionnelle vers la leucine (3) un transport membranaire peu efficace dû au caractère hydrophobe du groupement R<sub>4</sub>.

La souche G1073 n'exprimant aucune TK ( $\Delta tktA \Delta tktB$  / vecteur vide pSP100) est capable de se développer mais très lentement (G = 700 heures). Ce résultat inattendu suggère la présence d'une ou plusieurs enzymes, distincts de la TK, qui permettraient la conversion de la sonde **3** en acide aminé.

Souche	Génotype	Plasmide pUC (« high-copy »)	Temps de génération (G)		
			Sans apport	Leucine (0,3 mM)	Sonde <b>3</b> (3 mM)
G1074	$\Delta tktA \Delta tktB$ $\Delta leuABCD$	pDRI5 (TKL1+)	Pas de croissance	6h30	125h
G1073		pSP100 (vecteur vide)	Pas de croissance	3h50	700h

**Tableau 34 : Croissance des souches auxotrophes pour la leucine possédant un plasmide de type pUC**  
(Annexe 13)

En présence du plasmide pSU (conduisant à un faible nombre de copies au sein de la cellule) les temps de génération obtenus sont du même ordre de grandeur qu'avec pour la souche G1074 (pUC TKL1+) (Tableau 35). Ce résultat suggère que le type de plasmide utilisé semble avoir peu d'influence sur l'efficacité de la complémentation. En revanche nous n'avons obtenu aucune croissance avec la souche G1979.

Souche	Génotype	Plasmide pSU (« low-copy »)	Temps de génération (G)		
			Sans apport	Leucine (0,3 mM)	Sonde <b>3</b> (3 mM)
G1983	$\Delta tktA \Delta tktB$ $\Delta leuABCD$	pGEN377 TKL1+	Pas de croissance	4h20	100h
G1979		pVDM18 (vecteur vide)	Pas de croissance	Pas de croissance	Pas de croissance

**Tableau 35 : Croissance des souches auxotrophes pour la leucine possédant un plasmide de type pSU**  
(Annexe 13)

### 2.3.2.5. Utilisation de la sonde **4** comme précurseur de la méthionine

Comme indiqué précédemment, la croissance optimale (parmi les 3 concentrations testées 0,3 ; 1 et 3 mM) a été obtenue pour une concentration de 3 mM (courbes en Annexe 12). En présence de méthionine (0,3 mM) les souches transformées avec un plasmide de type pUC (Tableau 36) ou de type pSU (Tableau 37) conduisent à des temps de génération du même ordre de grandeur (environ 4 à 5 heures). En présence des compléments (Aro Shi B6), la présence ou l'absence de TK semble avoir peu d'influence sur le temps de génération en présence de méthionine comme indiqué précédemment.

Souche	Génotype	Plasmide pUC (« <i>high-copy</i> »)	Temps de génération (G)		
			Sans apport	Méthionine (0,3 mM)	Sonde <b>4</b> (3 mM)
G1242	$\Delta tktA \Delta tktB$ $\Delta metA$	pDRI5 TKL1+	Pas de croissance	4h25	7h15
G1241		pSP100 (vecteur vide)	Pas de croissance	4h40	10h30

**Tableau 36 : Croissance des souches auxotrophes pour la méthionine possédant un plasmide de type pUC**  
(Annexe 14)

La souche G1242 n'exprimant que la TK est bien capable de se développer avec un temps de génération pratiquement du même ordre de grandeur qu'en présence de méthionine (ou qu'en présence de l'aldéhyde  $\alpha$ -hydroxylé correspondant résultat obtenu précédemment). La croissance est beaucoup plus rapide qu'en présence de la sonde **3**. De façon inattendue, la souche G1241 n'exprimant aucune TK, est tout de même capable de se développer en présence de la sonde **4** néanmoins avec un temps de génération plus lent dans le cas du vecteur pSU.

Souche	Génotype	Plasmide pSU (« <i>low-copy</i> »)	Temps de génération (G)		
			Sans apport	Méthionine (0,3 mM)	Sonde <b>4</b> (3 mM)
G1984	$\Delta tktA \Delta tktB$ $\Delta metA$	pGEN377 TKL1+	Pas de croissance	3h45	6h00
G1980		pVDM18 (vecteur vide)	Pas de croissance	5h45	20h15

**Tableau 37 : Croissance des souches auxotrophes pour la méthionine possédant un plasmide de type pSU**  
(Annexe 14)

### **2.3.3. Conclusion**

L'utilisation des sondes **3** et **4** comme source d'acides aminés a été testée dans des souches de *E. coli* auxotrophes pour la leucine et la méthionine dont l'activité TK est codée uniquement par le gène TKL1 de levure (souches G1074 et G1242).

Les résultats obtenus montrent que les sondes **3** et **4** sont capables de satisfaire aux besoins nutritionnels en acides aminés des bactéries auxotrophes mais à des concentrations 10 fois plus élevées qu'en présence des acides aminés. La sonde **4** permet une croissance très proche de celle obtenue en présence de méthionine alors que la croissance en présence de **3** est moins favorable. Ces résultats sont cohérents avec les études *in vitro* montrant que la sonde **4** est un meilleur substrat donneur de la TK que la sonde **3** et avec les études *in vivo* menées en présence des différents intermédiaires indiquant toujours une croissance plus favorable avec les précurseurs de la méthionine.

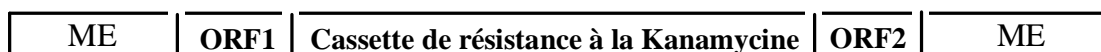
Cependant les résultats montrent qu'une complémentation partielle est obtenue en absence de la TK (souches témoins G1073 et G1241). En conséquence, la croissance cellulaire enregistrée dans les souches exprimant la TK de levure ne résulte pas de la seule activité de celle-ci. Aucune autre enzyme à notre connaissance n'est capable de cliver une unité hydroxyacétyle. D'autres enzymes sont donc capables transformer les sondes **3** et **4** en précurseurs des acides aminés leucine et méthionine.

## **2.4. Optimisation du test de sélection en présence de la sonde 4**

Il apparaît nécessaire pour l'établissement d'un test de sélection spécifique de la TK d'inactiver cette voie parallèle indépendante de la TK. Nous avons donc entrepris de constituer une banque de mutants d'inactivation par insertion aléatoire d'un transposon dans le chromosome de la souche G1146 ( $\Delta tktA \Delta tktB \Delta metA$ ) et de cribler cette banque en présence de la sonde **4**. L'objectif est de sélectionner un ou des mutants pour lesquels la croissance en présence de la sonde **4** est annulée ou réduite et dont la voie indépendante de la TK a été inactivée. La localisation du site d'insertion du transposon permettra l'identification éventuelle de la ou des enzyme(s) impliquée(s) dans la voie indépendante de la TK.

### **2.4.1. Création d'une banque de mutants d'insertion à partir de la souche G1146**

Un transposome est un complexe stable formé entre une transposase et un transposon. Le transposon utilisé possède un gène de résistance à la kanamycine encadré par deux séquences mosaïques reconnues par la transposase (Figure 196).



**Figure 196 : Représentation d'un transposon**  
(ME : séquence mosaïque ; ORF1 : origine de réplication)

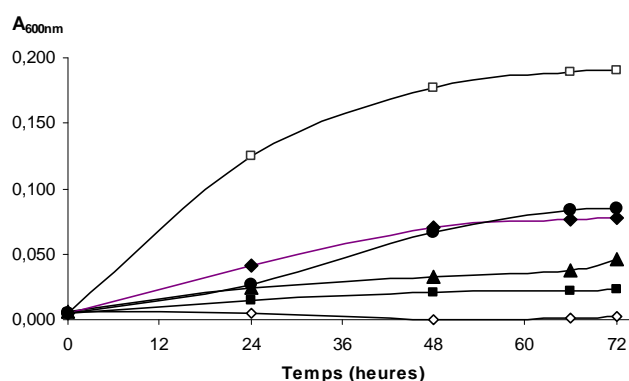
Ce transposome présente la propriété de pouvoir être transformé dans une cellule par électroporation et d'effectuer une insertion aléatoire du transposon sur le génome de la cellule transformée. Cette insertion permet d'une part l'inactivation d'un gène s'il s'insère au niveau de celui-ci et d'autre part confère une résistance à la kanamycine.

Après transformation de la souche G1146 par le transposome EZ-Tn5™ <KAN-2>Tnp (Epicentre®) et sélection en présence de kanamycine, nous avons obtenu une banque d'environ 11000 clones résistants à la kanamycine que nous avons conservé en plaques 384 puits à - 80 °C. Sachant que le génome de *E. coli* code pour environ 4200 protéines, la taille de la banque de mutants est susceptible de présenter un mutant d'insertion pour chacun des gènes correspondants.

## 2.4.2. Criblage de la banque de clones obtenue par insertion du transposon

### 2.4.2.1. Etude de croissance de la souche G1146

Dans un premier temps, nous avons cherché à optimiser, en plaques 96 puits, la croissance de la souche G1146 en présence de la sonde 4 ou de la méthionine afin de déterminer les conditions optimales de croissance. Nous avons fait varier la concentration de 4 et le temps de culture (Figure 197).



**Figure 197 : Etude de croissance de la souche G1146 en présence de la sonde 4 ou de méthionine**  
(□ : méthionine 0,3 mM ; ◇ : sans méthionine ; sonde 4 : ■ 0,4 mM ; ▲ 0,6 mM ; ◆ 0,8 mM ; ● 1 mM)

Après 72 heures de croissance en microplaques, les cultures atteignent une croissance optimale à partir de 0,8 mM. Nous n'observons pas de différence significative pour les

concentrations supérieures. Le criblage a donc été envisagé avec un temps de culture de 72 heures en présence de la sonde **4** (0,8 mM).

#### 2.4.2.2. Criblage de la banque en présence de la sonde 4

La caractérisation de la croissance en présence de la sonde **4** comme seule source de méthionine est réalisée après une phase d'adaptation des clones en milieu minimum en présence de méthionine (Figure 198).



Figure 198 : Etapes nécessaires au criblage de la banque de mutants d'insertion de la souche G1146

##### ➤ Adaptation des cellules au milieu minimum

Dans un premier temps, une étape d'adaptation des clones au milieu minimum (MS Glc Aro Shi B6 Kan et méthionine 0,3 mM) pour que les cellules adaptent leur métabolisme au milieu minimum (MS) après avoir été cultivées en milieu riche (LB). Les clones de la banque ont été répliqués par un ensemencement réalisé au moyen d'un hérisson et incubés à 37 °C pendant 72 heures. Le suivi de la croissance a été effectué par lecture de l'absorbance à 600 nm avec un lecteur de microplaques. La plupart des clones ont poussé dans ces conditions et atteint des densités satisfaisantes et homogènes.

##### ➤ Criblage en présence de la sonde 4

Nous avons alors réalisé le criblage de la banque de clones en présence de la sonde **4**. Les répliques ont été réalisées par prélèvement d'un petit volume de culture (5 µL) à partir des plaques précédentes au moyen d'un pipetman multicanaux. En effet, les premières répliques réalisées au moyen d'un hérisson ont conduit à une croissance très hétérogène des clones de la banque, sans doute due à un ensemencement trop faible.

Trois milieux minimum (MS Glc Aro Shi B6 Kanamycine) ont été ensemencés : (1) un milieu contenant 0,8 mM de sonde **4** (2) un milieu sans source de méthionine (témoin qui permet d'évaluer la croissance imputable à la présence de méthionine dans la culture transférée lors de l'ensemencement) et (3) un milieu contenant la méthionine (0,3 mM). La

croissance des différentes répliques a été réalisée à 37 °C sur une période de 48 à 72 heures et suivie par lecture de l'absorbance à 600 nm au moyen d'un lecteur de microplaque.

➤ Traitement des résultats

Nous avons corrigé les densités optiques mesurées en présence de la sonde **4** par les densités optiques mesurées en l'absence de source de méthionine.

$$DO_{\text{sonde 4 corrigée}} = DO_{\text{sonde 4}} - DO_{\text{sans méthionine}}$$

Pour identifier les clones les moins aptes à convertir la sonde **4** en méthionine, nous avons calculé le rapport X entre la densité optique corrigée en présence de la sonde **4** ( $DO_{\text{sonde 4 corrigée}}$ ) et la densité optique observée en présence de méthionine ( $DO_{\text{méthionine 0,3 mM}}$ ).

$$X = DO_{\text{sonde 4 corrigée}} / DO_{\text{méthionine 0,3 mM}}$$

A l'issu du criblage des 11 000 clones, nous avons donc sélectionné une population de 117 clones présentant un rapport X compris entre 0 et 0,3.

➤ Analyse des clones sélectionnés en présence de la sonde 4

Parmi les 117 clones sélectionnés, 22 ayant un ratio X compris en 0 et 0,10 ont été testés à nouveau dans les conditions du criblage. Leur croissance a été évaluée en la comparant à celle de la souche témoin G1146 et en calculant leur ratio X. Les 22 clones ont obtenu des valeurs de X comparables à celles obtenues avec la souche témoin G1146 (X compris entre 0,40 et 0,90).

L'absence de croissance ou la croissance faible observée lors du criblage de la banque est probablement due à des erreurs de pipetage lors des ensemencements.

Suite aux premiers résultats obtenus, 48 clones (possédant un ratio X compris entre 0,10 et 0,30) ont été testés à nouveau dans les conditions du criblage. Le test a été répété trois fois à partir de pré-cultures différentes. Une vingtaine de clones présentent un ratio X inférieur à 0,3 de façon reproductible.

2.4.2.3. Conclusion

Nos avons identifié 48 clones auxotrophes pour la méthionine délétés en *tktA* et *tktB* (souche G1146 ( $\Delta tktA \Delta tktB \Delta metA$ )) qui transformés par le transposome conduisent en présence de la sonde **4** à une croissance inférieure à celle obtenue avec la souche non transformée par le transposome. Ce résultat est à confirmer en présence de ces mêmes clones transformés par le plasmide exprimant TKL1 de levure. Nous pourrions voir alors si le bruit de



fond observé précédemment est notablement réduit ou inexistant. L'analyse par séquençage du génome des clones transformés par le transposome nous renseignera alors sur la ou les enzymes responsables de la conversion de la sonde **4** en acide aminé.

### 3. Création des banques de TK mutées

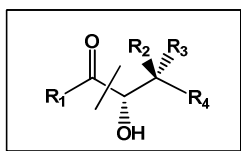
Nous cherchons à élargir le champ d'application de la réaction catalysée par la TK qui est limité à l'obtention du motif cétose-D-*thréo* (3*S*, 4*R*). Dans ce but, la modification de la spécificité de substrat de la TK passe par la modification du gène TKL1 codant pour cette enzyme. Le laboratoire s'intéresse particulièrement à la TK de *Saccharomyces cerevisiae* ayant participé à l'étude du site actif de cette enzyme en collaboration avec le Pr. Schneider de l'Institut Karolinska (Stockholm). Cette source de TK était la seule dont la structure 3D et la spécificité de substrat étaient connues.

Nos objectifs visent à modifier la spécificité de substrat de la TK pour accéder à des motifs inaccessibles avec l'enzyme sauvage :

- motif cétose L-*érythro*. Il s'agit de modifier, dans ce cas, l'énantiosélectivité vis-à-vis du substrat accepteur.

- motif aldose D-*thréo*. Il s'agit de modifier la spécificité de la TK vis-à-vis du substrat donneur pour qu'un groupement formyle soit transféré à la place d'un groupement hydroxyacétyle

Pour parvenir à ces objectifs nous avons envisagé d'utiliser une méthode de mutagenèse « semi-rationnelle » basée sur la connaissance du site actif de la TK. Les banques obtenues seront introduites dans des souches de sélection et criblées en présence des sondes préparées précédemment présentant le motif cétose L-*érythro* et aldose D-*thréo*.

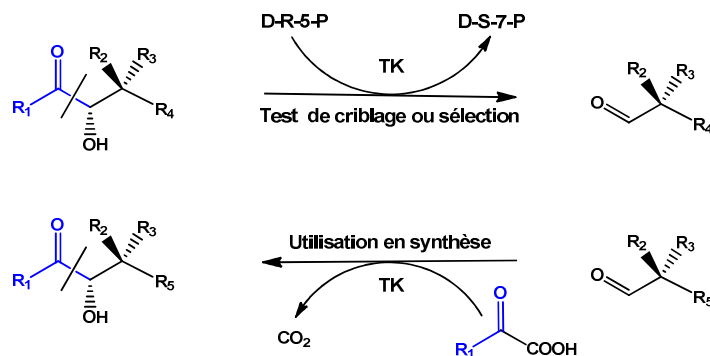


**Cétose L-*érythro***  $R_1=CH_2OH$ ;  $R_2=OH$ ;  $R_3=H$  : sélection de TK capables d'inverser l'énantiosélectivité

**Aldose D-*thréo***  $R_1=H$ ;  $R_2=H$ ;  $R_3=OH$  : sélection de TK capables de transférer un groupement formyle

**Figure 199 : Sondes utilisées pour la sélection des TK mutées**

Ainsi, une TK mutée reconnaissant le motif cétose-L-érythro ou aldose D-thréo des sondes pourrait être capable de créer ces motifs en présence des substrats donneurs et accepteurs que nous souhaitons utiliser dans un but synthétique en raison de la réversibilité de la réaction catalysée par la TK (Figure 200).



**Figure 200 : Réversibilité de la réaction catalysée par la TK**

Dans le cadre de cette thèse nous nous sommes attachés dans un premier temps à la modification de l'énantiosélectivité. Dans ce but nous avons construit une banque de TK mutées selon une méthode de mutagenèse « semi-rationnelle » au niveau du site actif.

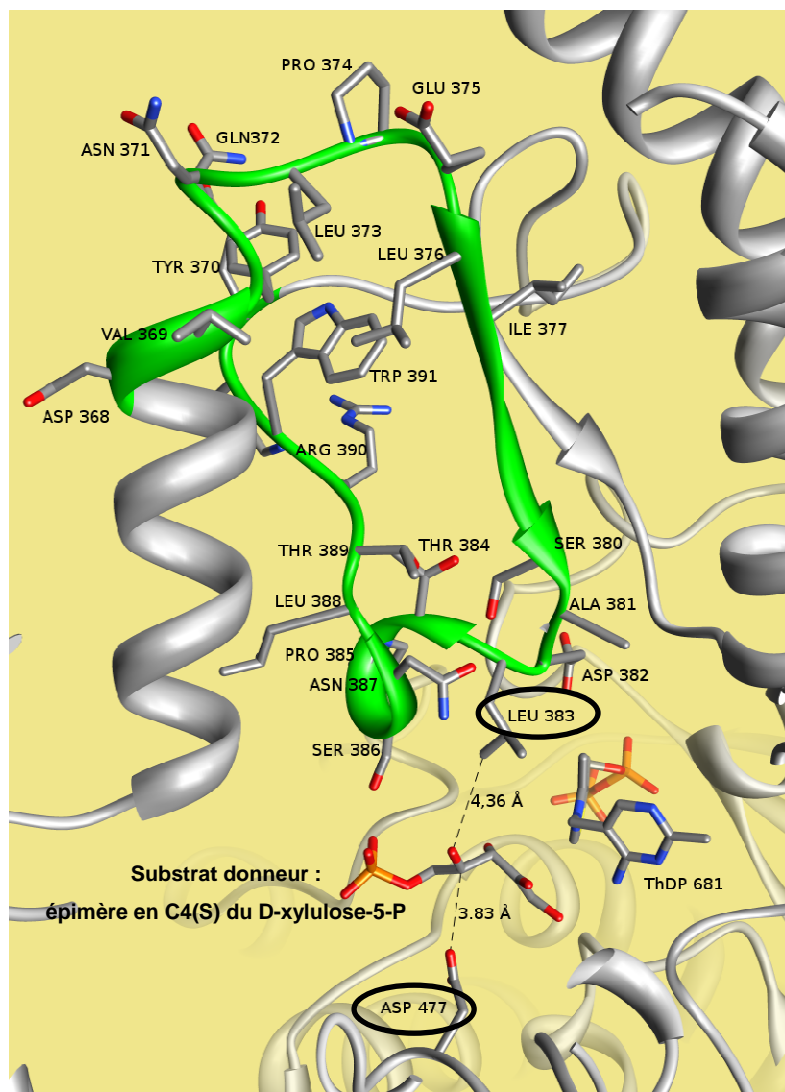
### 3.1. Stratégie

D'après la structure 3D de la TKL1 de levure, nous avons pu définir une séquence qui d'après les interactions entre l'enzyme et son substrat pourrait permettre d'obtenir des TK mutées capables d'inverser l'énantiosélectivité.

Nous avons choisi une zone encadrant le résidu Leu383. En effet, au niveau du site actif de l'enzyme, ce résidu se trouve à l'opposé du résidu Asp477, qui contrôle l'énantiosélectivité vis-à-vis du C2 (*R*) de l'aldéhyde ou du carbone 4 (*R*) du cétose. Dans la figure ci-dessous nous avons placé l'épimère du D-xylulose-5-phosphate dont le C4 est (*S*). Nous observons que le groupe hydroxyle pointe vers la chaîne latérale de la leucine. L'interaction pourrait être favorisée par une mutation faisant intervenir une chaîne latérale chargée comme celle d'un résidu Glu (Figure 201).

Nous avons ensuite introduits des mutations aléatoires sur une séquence d'une taille de 13 acides aminés centrée sur le résidu Leu383. La séquence sélectionnée va du résidu Ile377 au résidu Thr389 (c'est-à-dire de la base 1130 à la base 1167 du gène) :

Ile377 – Gly378 – Gly379 – Ser380 – Ala381 – Asp382 – **Leu383** – Thr384 – Pro385 – Ser386 – Asn387 – Leu388 – Thr389



**Figure 201 : Vue du site actif en présence de l'épimère du D-xylulose-5-phosphate C4 (S) : résidus Leu383 et Asp477 à l'opposé l'un de l'autre (en vert boucle contenant la séquence d'intérêt centrée sur Leu383)**

En effet, une séquence de l'ordre d'une quinzaine de résidus permet, d'une part, d'obtenir une banque de mutants dont la taille est compatible avec le protocole de sélection, et d'autre part, de limiter les modifications de la structure tridimensionnelle de l'enzyme.

Pour introduire les mutations nécessaires, nous avons choisi une méthode de mutagenèse semi-aléatoire basée sur l'utilisation de « cassettes dégénérées ». Cette méthode permet d'introduire des mutations aléatoires sur une courte séquence ciblée au niveau du site actif de la protéine. Cette stratégie est, d'après l'analyse de la littérature, souvent utilisée lorsque l'on souhaite modifier la spécificité de substrat d'une enzyme.

## 3.2. Création de la banque de TK mutées destinées à inverser l'énantiosélectivité

### 3.2.1. Stratégie utilisée

Les différentes étapes permettant la construction des banques de TK mutées sont indiquées ci-dessous. Il est nécessaire tout d'abord de construire le vecteur plasmidique présentant les sites de restriction appropriés pour cloner les inserts contenant les séquences mutées (« cassettes dégénérées ») qui conduiront aux banques de TK mutées après transformation dans la souche de *E. coli* appropriée (Figure 202).

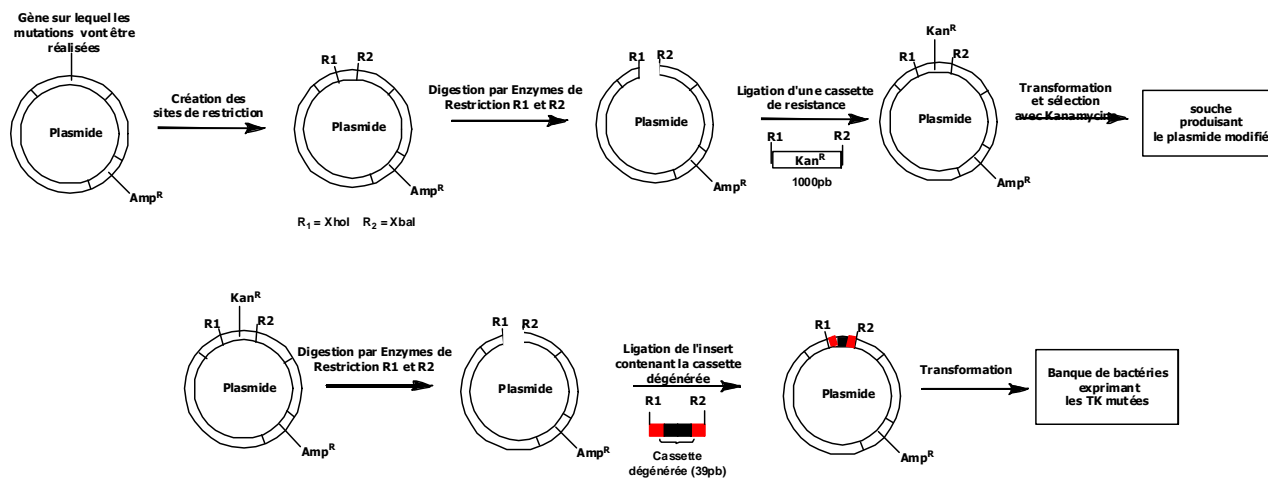


Figure 202 : Etapes conduisant à la construction des banques de TK mutées

#### ➤ Obtention de sites de restriction uniques par mutations silencieuses

Pour pouvoir introduire les inserts dans la position que nous souhaitons au niveau du gène, il est nécessaire de créer des sites de restriction tout en s'assurant que la création de ces sites ne modifie pas la séquence protéique de la TK.

L'équipe du Génoscope a introduit 3 mutations silencieuses sur le gène. Ces trois mutations silencieuses (base 1097 : T muté en C ; base 1182 : T muté en C ; base 1185 : T muté en A) ont permis de créer deux sites de restriction XhoI et XbaI uniques situés de chaque côté de la séquence que nous voulons muter. Le site XhoI se trouve en amont de la séquence et le site XbaI se trouve en aval de la séquence.

#### ➤ Obtention des cassettes dégénérées

Nous avons envisagé de construire deux banques de cassettes dégénérées à partir de deux types de séquences (comportant les 13 résidus ciblés) qui diffèrent par le codon qui correspond à Leu 383 dans la séquence sauvage .

(1) l'une (Leu 383) comporte à la place du codon TTA du résidu Leu383 un codon CTG codant toujours pour Leu mais limitant l'apparition de codons stop

(2) l'autre (Glu383) comporte à la place du codon TTA un codon GAA qui correspond à un Glu (pour les raisons évoquées ci-dessus) et permettra aussi de favoriser l'apparition de codant correspondant à des résidus chargés

Les inserts comportant les séquences dégénérées et les deux sites de restriction XhoI et XbaI ont été obtenus à partir d'une banque d'oligonucléotides dopés synthétisés par la société MWG (85 % de la base correcte et 5 % de chacune des trois autres bases)

#### ➤ Ligation et transformation

Les deux banques d'inserts comportant les cassettes dégénérées ont été clonées dans des plasmides. La première étape consiste à effectuer une digestion par les enzymes XhoI et XbaI du plasmide TKL1/Kan<sup>R</sup> afin d'exciser le gène de résistance à la kanamycine pour pouvoir le remplacer par les inserts.

L'étape de ligation a été réalisée en utilisant un rapport de concentration insert/plasmide de l'ordre de 7. Les plasmides et les inserts ont été dosés par spectrophotométrie à 260 nm afin de contrôler ces proportions. Après transformation et sélection en présence de kanamycine, nous avons obtenu deux banques de 10 000 transformants (clones contenant le plasmide ayant intégré une cassette dégénérée).

### **3.2.2. Analyse des mutations**

#### ➤ Analyse des taux de mutations

Pour chacune des deux banques (centrées sur Leu383 et Glu383), un séquençage a été réalisé sur un échantillon de cent clones après amplification par RCA (rolling-circle amplification). Cette analyse a permis de mettre en évidence un taux de 50 % de plasmide n'ayant pas intégré de cassette. Ce taux un peu supérieur à celui qui est normalement obtenu (20 %) peut provenir de la structure du plasmide (c'est-à-dire des sites de restriction choisis) ou des conditions de ligation.

A partir de 40 séquences des plasmides ayant intégré une cassette dégénérée dans chacune des deux banques (Leu383 et Glu383) nous avons réalisé une analyse des pourcentages de mutation obtenus au niveau de la séquence nucléotidique (Tableau 38 et Tableau 39) et de la séquence protéique (Tableau 40 et Tableau 41). Le but est de comparer les résultats expérimentaux aux résultats théoriques calculés d'après les conditions utilisées pour créer les séquences dégénérées soit 15 % de mutations par base.

Séquence « sauvage »	A	T	T	G	G	T	G	G	T	T	C	T	G	C	C	G	A	T	C	T
% de mutation	14	16	14	9	12	19	16	7	19	14	26	19	16	23	19	14	5	16	23	23
Séquence « sauvage »	G	A	C	A	C	C	T	T	C	T	A	A	C	T	T	G	A	C	C	
% de mutation	21	14	35	9	30	33	14	9	28	12	26	19	28	5	14	16	14	30	19	

**Tableau 38 : Taux de mutation par base de la cassette dégénérée (banque Leu383)**

Séquence « sauvage »	A	T	T	G	G	T	G	G	T	T	G	A	A	C	C	G	A	T	C	T
% de mutation	12	20	17	32	12	27	10	15	15	17	24	10	17	29	27	17	27	10	20	27
Séquence « sauvage »	G	A	C	A	C	C	T	T	C	T	A	A	C	T	T	G	A	C	C	
% de mutation	17	20	15	22	17	27	7	17	20	12	24	29	12	5	10	27	20	32	10	

**Tableau 39 : Taux de mutation par base de la cassette dégénérée (banque Glu383)**

Pour les deux banques analysées Leu383 et Glu383, les moyennes des taux de mutation par base sont respectivement de 17,9 et 17,7 %, résultat très proche de celui attendu montrant l'efficacité de la méthode.

Résidu « Sauvage »	Ile	Gly	Gly	Ser	Ala	Asp	Leu	Thr	Pro	Ser	Asn	Leu	Thr
% mutation	33	20	25	43	40	25	33	40	48	38	45	30	38

**Tableau 40 : Taux de mutation par résidu de la cassette dégénérée de la banque Leu383**

Résidu « Sauvage »	Ile	Gly	Gly	Ser	Ala	Asp	Glu	Thr	Pro	Ser	Asn	Leu	Thr
% mutation	33	43	23	38	38	43	48	30	40	38	50	25	45

**Tableau 41 : Taux de mutation par résidu de la cassette dégénérée (banque Glu383)**

L'analyse des mutations introduites au niveau des séquences protéiques des deux banques va nous permettre d'estimer si le taux de mutation introduit n'est pas trop élevé. En effet, il est nécessaire que le nombre de résidus mutés ne soit pas trop élevé afin de limiter les modifications structurales des TK qui pourraient être néfastes pour l'activité de l'enzyme.

Les moyennes des taux de mutations pour chaque résidu sont de 35 et 38 % pour les banques Leu383 et Glu383 respectivement, ce qui correspond à une moyenne de 4,6 et 5,1 résidus mutés par séquence.

Compte tenu de l'analyse de la littérature et de l'expérience du laboratoire, ces taux de mutation sont compatibles au maintien de l'activité de l'enzyme.

➤ *Analyse du type de mutations introduites au niveau de la séquence protéique*

Séquence initiale	I Ile377	G Gly378	G Gly379	S Ser380	A Ala381	D Asp382	L Leu383	T Thr384	P Pro385	S Ser386	N Asn387	L Leu388	T Thr389	total
A	0	1	0	0	25	2	0	0	3	1	0	0	0	32
R	0	1	3	0	0	0	2	4	3	0	0	0	0	13
N	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	23	0	0	26
D	0	3	1	0	4	31	0	0	0	0	4	0	0	43
C	2	1	5	2	0	0	0	0	0	1	0	0	2	13
Q	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	2
E	0	0	0	0	1	3	0	2	0	1	0	0	0	7
G	0	33	31	0	2	0	0	0	0	0	1	0	0	67
H	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	2	0	0	5
I	28	0	0	1	0	0	2	5	1	0	1	0	4	42
L	0	0	0	1	0	0	28	0	2	0	0	29	0	60
K	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	4
M	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	4
F	2	0	0	4	0	0	1	0	0	4	0	4	0	15
P	0	0	0	3	2	0	3	0	22	1	0	0	0	31
S	2	1	0	24	1	0	0	3	3	26	3	2	8	73
T	3	0	0	3	3	0	0	25	2	1	3	0	26	66
W	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Y	0	0	0	2	1	2	0	0	1	5	3	0	1	15
V	1	1	1	0	2	0	2	1	1	0	0	1	0	10
STOP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3	0	4
Séquences analysées	41	41	41	41	41	41	41	41	41	41	41	41	41	533
Nbre d'acides aminés non mutés:	28	33	31	24	25	31	28	25	22	26	23	29	26	351

Tableau 42 : Analyse des mutations présentes sur les séquences protéiques de 13 résidus (banque Leu 383)  
(échantillon de 40 séquences mutées)

Séquence initiale	I Ile377	G Gly378	G Gly379	S Ser380	A Ala381	D Asp382	E Glu383	T Thr384	P Pro385	S Ser386	N Asn387	L Leu388	T Thr389	total
A	0	0	4	1	26	2	3	2	2	3	0	0	2	45
R	0	6	1	0	0	0	0	2	6	0	3	0	1	19
N	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22	0	3	27
D	0	2	0	1	3	23	2	0	1	0	1	0	0	33
C	0	3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	4
Q	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	3
E	0	0	0	0	1	2	21	0	0	0	0	0	0	24
G	0	23	31	0	1	4	3	0	0	0	0	0	0	62
H	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	2	0	0	7
I	28	0	0	0	1	0	0	1	0	0	2	0	6	38
L	1	0	0	0	0	0	1	0	4	0	0	31	0	37
K	0	0	0	0	1	0	3	1	0	0	2	0	0	7
M	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	5
F	1	0	0	1	0	1	0	0	0	6	0	6	1	16
P	0	0	0	3	2	0	0	3	24	1	0	0	3	36
S	2	2	3	27	1	1	0	1	3	26	2	0	3	71
T	3	0	0	2	1	0	0	30	1	3	5	0	22	67
W	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0	4
Y	0	0	0	6	1	1	0	0	0	2	2	2	0	14
V	2	3	3	0	4	3	5	0	1	0	0	0	0	21
STOP	0	2	0	1	0	1	2	0	0	0	0	0	0	6
Séquences analysées	41	41	41	41	41	41	41	41	41	41	41	41	41	546
Nb d'acides aminés non mutés:	28	23	31	27	26	23	21	30	24	26	22	31	22	334

Tableau 43 : Analyse des mutations présentes sur les séquences protéiques de 13 résidus (banque Glu 383)  
(échantillon de 40 séquences mutées)

Pour chacune des deux banques (Leu383 et Glu383) nous avons analysé par séquençage d'un échantillon de 40 séquences dégénérées, les mutations obtenues au niveau des 13 résidus de la séquence que nous avons ciblée (Tableau 42 et Tableau 43).

La colonne de gauche (en vert) indique les 20 acides aminés, la première ligne (en jaune) les résidus présents dans la séquence initiale. A l'intersection des lignes et des colonnes, sont indiquées le nombre de séquences présentant le résidu considéré (en rouge).

Nous constatons que les résidus présents dans la séquence initiale sont les plus conservés (cases grisées) compte-tenu des conditions utilisées pour créer la dégénérescence (taux de mutations de 35 à 38 % au niveau de la séquence protéique).

Cette observation concerne notamment Leu383 et Glu383 et aussi tous les autres résidus. On note également que les mutations introduites concernent certains acides aminés plus que d'autres (colonne en bleu) ce qui est en accord avec le code génétique (nombre variable de codons possibles pour un même acide aminé).

#### ➤ Transformation des banques dans une souche n'exprimant pas la TK (G91)

Nous avons réalisé un premier criblage des deux banques Leu 383 et Glu 383 pour étudier l'activité des TK mutées *in vivo* en présence des substrats naturels. Pour cela, nous avons transformé les banques dans la souche G91 qui n'exprime aucune activité TK (*tktA* et *tktB* de *E. coli* délétés) et qui est donc incapable de se développer en milieu minimum (la TK étant indispensable à la croissance de la cellule). Nous avons obtenu 10 000 transformants pour chaque banque (d'après une numération sur boîte de Petri réalisée à partir d'un prélèvement de la banque étalé en milieu LB).

Après culture sur milieu minimum gélosé en présence de glucose, 50 clones sont aptes à se développer dans le cas de la banque Leu 383 (après séquençage on note la présence de Leu383 pour 48 clones) et 6 clones seulement dans la banque Glu383 (après séquençage on note la présence en position 383 de 2 résidus Leu, 2 résidus Glu et 2 deux résidus Gln) (Annexes 5 et 6).

La majorité des transformants exprimant les TK mutés issues des deux banques, sont donc incapables de croître. Ces résultats indiquent que la séquence qui a été choisie au niveau du site actif a une forte influence sur l'activité de la TK *in vivo*. Les mutations générées entraînent des modifications du site actif qui perturbent le mécanisme catalytique de l'enzyme et/ou son énantiosélectivité.



D'après l'analyse des clones ayant la capacité de croître, la présence de Leu 383 pour 48 d'entre eux semble montrer que ce résidu est nécessaire à l'activité de la TK.

De plus, l'étude des séquences des TK des 50 clones de la banque Leu383 a montré que les 13 résidus de la cassette ne présentaient la même permissivité de mutation. En effet, parmi les 50 clones, le nombre de mutants pour un résidu donné est compris entre 0 et 23. Pour exemples, le résidu Pro385 est substitué par un autre résidu pour 23 clones (dont 9 présentent un résidu Thr385) et le résidu Asp382 est présent chez les 50 clones.

### **3.2.3. Conclusion**

Nous avons construit deux banques de TK mutées à partir d'une séquence de 13 résidus centrés sur Leu383 choisis d'après la structure du site actif. Pour l'une des deux banques la séquence initiale comporte le résidu Leu383 et pour l'autre celui-ci a été remplacé par un Glu. En effet dans le site actif Glu383 se trouve à l'opposé de Asp477, qui contrôle l'énantiosélectivité vis-à-vis du C2 (*R*) de l'aldéhyde accepteur ou du carbone 4 (*R*) du cétose, substrat donneur. L'interaction des groupes hydroxyles portés par les carbones de configuration opposée (*S*) pourrait être favorisée par une mutation faisant intervenir une chaîne latérale chargée comme un Glu en position 383.

A l'issue du criblage des deux banques dans la souche de G79 qui n'exprime aucune activité TK (*tktA* et *tktB* de *E. coli* délétés) et en milieu de culture minimum, la majorité des transformants exprimant les TK mutés issues des deux banques, sont incapables de croître. La séquence choisie au niveau du site actif a donc une influence notable sur l'activité de la TK et peut-être sur l'énantiosélectivité.

L'étape suivante consistera à transformer ces deux banques dans les souches auxotrophes pour la méthionine (délétées en *tktA* et *tktB*) et à les tester en présence de la sonde cétose-L-érythro **7** (lorsque le test de sélection sera optimisé) dont la configuration est inversée au niveau du C4 (correspondant à l'énantiosélectivité de la TK) par rapport au motif naturel (cétose D-*thréo*).

Dans l'objectif de trouver des TK mutées capables de transférer un groupement formyle, une stratégie analogue sera envisagée pour créer les banques à partir d'une séquence judicieusement choisie au niveau du site actif. La sélection dans ce cas sera réalisée avec la sonde aldose D-*thréo* portant un groupement formyle et précurseur de la méthionine.

## **Conclusion et perspectives**



Ces travaux destinés au développement d'un test de sélection de TK comportent deux aspects : une partie dédiée à la synthèse des sondes et une autre consacrée à des études enzymatiques et biologiques.

Les sondes que nous avons synthétisées ont une structure originale puisqu'elles présentent à la fois un motif cétose-D-*thréo* (**1**, **2**, **3**, **4**, **5**) ou L-*érythro* (**6**, **7**) ou aldose D-*thréo* (**8**) et un groupement R<sub>4</sub> qui correspond à la chaîne latérale d'un acide aminé. Les sondes **3**, **4**, **6**, **7** et **8** n'ont pas été décrites dans la littérature (les sondes **8** et **9** sous forme protégée). Pour chaque composé nous avons comparé différentes voies de synthèse soit en présence d'enzymes catalysant la formation stéropécifique de liaison C-C (TK, aldolases) soit par voie chimique (organocatalyse, Sharpless) afin de déterminer les stratégies les plus performantes.

Pour l'obtention du motif cétose D-*thréo*, les enzymes ont été privilégiées (TK, aldolase). La réaction catalysée par la TK requiert des aldéhydes  $\alpha$ -hydroxylés (racémiques et/ou énantiopurs) que nous avons synthétisés avec des rendements satisfaisants. Les synthèses catalysées par la TK ont conduit aux cétooses **1** (R<sub>4</sub> = CH<sub>3</sub>), **3** (R<sub>4</sub> = CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) et **4** (R<sub>4</sub> = CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>3</sub>). Seule la sonde **2** (R<sub>4</sub> = CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) n'a pas été préparée en raison sans doute de l'encombrement stérique proche de la fonction aldéhyde du substrat. Ces résultats nous permettent de prévoir que selon la réaction inverse (utilisée dans le cadre du test de sélection) les cétooses D-*thréo* **1**, **3**, **4** seront des substrats donneurs pour la TK. De façon à optimiser les rendements de synthèse nous avons également envisagé d'obtenir ces composés avec des aldolases FDPA et FSA qui conduisent aussi au motif cétose D-*thréo*. La FSA récemment utilisée au laboratoire a permis d'accéder aux sondes **1**, **3**, **4** et **5** avec les meilleurs rendements par rapport à la TK et à la FDPA. L'avantage majeur de la FSA produite au laboratoire et récemment utilisée en synthèse est d'utiliser la DHA comme substrat donneur qui est commercial et peu coûteux par rapport à la DHAP. Cette étude constitue donc une première approche du potentiel synthétique de la FSA dont la spécificité de substrat est encore peu connue.

Les sondes cétooses L-*érythro* **6** (R<sub>4</sub> = CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) et **7** (R<sub>4</sub> = CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>) ont été obtenues selon une réaction d'aldolisation en présence de L-proline comme catalyseur. La voie de synthèse du composé **7** est originale car cette stratégie n'a pas été décrite à ce jour pour préparer des composés comportant un hétéroatome. Les rendements restent cependant à optimiser. Pour accéder au motif aldose D-*thréo*, deux stratégies ont été développées l'une chimique (Sharpless) et l'autre chimioenzymatique basée sur la coupure oxydante de la

liaison C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> du cétose *D-thréo* utilisé comme précurseur chiral. Seule, la sonde **8** (R<sub>4</sub> = CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) a été obtenue selon ces deux stratégies. La stratégie chimioenzymatique pourrait être adaptée à la synthèse de l'aldose *D-thréo* (R<sub>4</sub> = CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>) à partir du cétose *D-thréo* **4**.

Les études cinétiques réalisées *in vitro* par LC-MS montrent que les 4 sondes cétose *D-thréo* sont des nouveaux substrats donneurs de la TK de levure. Le composé **1** (R<sub>4</sub> = CH<sub>3</sub>) est le meilleur substrat, vient ensuite le composé **4** (R<sub>4</sub> = CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>) puis le composé **3** (R<sub>4</sub> = CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), et enfin le composé **5** (R<sub>4</sub> = CH<sub>2</sub>OH-CH<sub>3</sub>). Les composés **3** et **4** ont été choisis pour le développement du test de sélection. Bien que le composé **1** soit le meilleur substrat, il est difficile d'obtenir des souches auxotrophes pour la valine.

Afin de valider le test à partir des sondes **3** et **4** de nouvelles souches de *E.coli* auxotrophes et capables d'exprimer la TK de levure TKL1 uniquement (les gènes *tka* et *tkb* de *E.coli* sont délétées) ont été construites. Les études réalisées *in vivo* en présence des intermédiaires (aldéhydes α-hydroxylés, acides α-hydroxylés, acides α-cétoniques) proposés pour la transformation des composés **3** et **4** en acides aminés permettent tous de compléter l'auxotrophie des cellules hôtes. Ces résultats valident le schéma séquentiel (Figure 204).

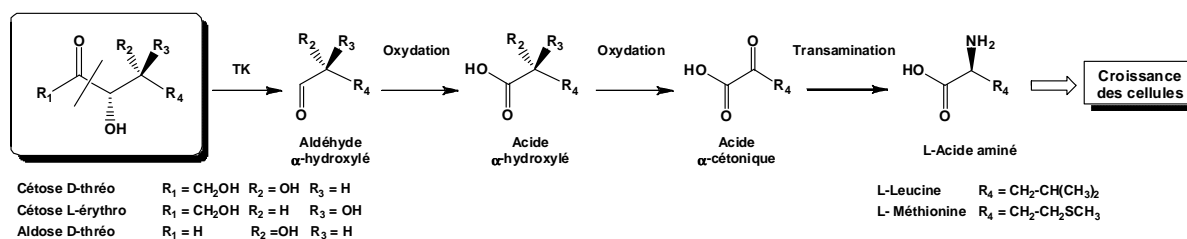


Figure 204 : Conversion des sondes **3** et **4** en leucine et méthionine

Les sondes **3** et **4** conduisent à la croissance des souches auxotrophes avec des taux de croissance plus favorables avec la sonde **4** précurseur de la méthionine. Ces résultats sont en adéquation avec ceux obtenus *in vivo* en présence des intermédiaires et aussi *in vitro*. Cependant la croissance cellulaire enregistrée dans les souches exprimant la TK de levure ne résulte pas de la seule activité de celle-ci. D'autres enzymes sont donc capables de catalyser une voie différente de celle envisagée pour accéder aux acides aminés. Pour mieux comprendre cette voie alternative, une banque de mutants d'inactivation a été construite par insertion aléatoire d'un transposon dans le chromosome d'une souche de *E. coli* délétée en transcétolase et auxotrophe pour la méthionine. Cette banque a été criblée sur le critère de la croissance en présence de la sonde **4**. Nous avons identifié 48 clones conduisant à une

croissance inférieure à celle obtenue avec la souche non transformée par le transposome. Ce résultat est à confirmer en présence des souches de *E. coli* exprimant TKL1 de levure afin de déterminer si le bruit de fond observé précédemment en présence de 4 est notablement réduit ou inexistant.

L'objectif final est d'utiliser ce test basé sur l'auxotrophie pour sélectionner des TK mutées dont la spécificité de substrat est modifiée. Nous nous sommes focalisés dans un premier temps sur l'inversion de l'énantiosélectivité en construisant des banques de TK mutées de façon semi aléatoire à partir d'une séquence de 13 résidus identifiée au niveau du site actif. Cette séquence est centrée sur Leu383 qui est à l'opposé de Asp477 dans le site actif, qui contrôle l'énantiosélectivité. A l'issue du criblage des deux banques (10 000 transformants chacune) dans une souche qui n'exprime aucune activité TK (nécessaire à la croissance) et en milieu de culture minimum, la majorité des transformants sont incapables de croître. La séquence choisie au niveau du site actif a donc une influence notable sur l'activité de la TK. Au sein de ces banques, il existe donc des candidats potentiellement intéressants pour l'inversion de l'énantiosélectivité. Pour vérifier cela, ces banques de TK mutées seront transformées dans les souches auxotrophes pour la méthionine avec la sonde cétose-L-érythro 7 (quand le test de sélection sera optimisé).

Ce travail constitue une première approche de la stratégie de sélection envisagée et les perspectives de ce travail sont nombreuses :

- l'aspect à approfondir en priorité est l'identification de la ou des enzymes responsables de la conversion des sondes cétose D-*thréo* en acides aminés sans l'intervention de la TK ce qui est intéressant sur le plan fondamental. En effet pour obtenir le motif acide aminé (2 carbones) à partir des sondes que nous avons conçues comportant un motif à 4 carbones, il est nécessaire de cliver une unité à deux carbones. La transformation de la banque de mutants d'inactivation par insertion aléatoire d'un transposon dans la souche de *E. coli* exprimant la TK nous renseignera sur la nature de cette ou de ces enzyme(s) et pourrait nous permettre d'éliminer ou de réduire le bruit de fond observé.

- quand nous aurons déterminé les conditions les plus favorables pour rendre le test spécifique de la TK, nous pourrons insérer les banques de TK mutées dans les souches appropriées. Dans ce but nous construirons sur la base de la stratégie développée pour l'inversion de l'énantiosélectivité une banque de TK mutées destinées à transférer un

groupement formyle. Les banques seront alors criblées avec les sondes présentant le motif adapté aux propriétés recherchées (motif cétose L-*érythro* ou aldose D-*thréo*).

L'objectif final est bien sûr d'obtenir selon cette stratégie originale des TK mutées capables de reconnaître des aldéhydes  $\alpha$ -hydroxylés de configuration inverse par rapport à l'enzyme sauvage ou encore capable de transférer un groupement formyle pour accéder à la série des cétones L-*érythro* et des aldoses.

## **Partie expérimentale**





# SYNTHESE ORGANIQUE

## Matériel

### Chromatographie

L'avancement des réactions est suivi par analyse chromatographique sur couche mince (CCM) en utilisant des plaques d'aluminium recouverte de silice (Merck® DC Gel de silice 60F<sub>254</sub>) et des systèmes d'éluant appropriés (dichloroéthane / méthanol ; cyclohexane / acétate d'éthyle ; pentane / éther ; isopropanol / eau). Les CCM sont révélées par exposition sous UV et par l'utilisation de révélateurs spécifiques : Vanilline, KMnO<sub>4</sub>, Molybdate Cérique, Ninhydrine ou I<sub>2</sub>.

Les produits sont généralement purifiés par colonne chromatographique en utilisant un gel de silice éclair (Merck® Gel de silice 40-63 µm) et un système d'éluant approprié (déterminé par CCM). La hauteur standard des colonnes réalisées est de l'ordre de 15 centimètres et le diamètre est choisi en fonction de l'échelle de la purification réalisée.

### Analyses spectroscopiques

Les pouvoirs rotatoires sont déterminés avec un polarimètre Jasco DIP 370 à 25°C pour la raie D du sodium ( $\lambda = 589$  nm). La concentration *c* (en %) est exprimée en gramme par décilitre.

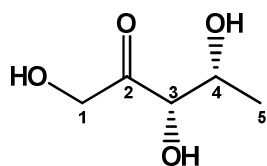
Les spectres RMN sont enregistrés sur l'appareil Bruker AC 400 (400 MHz en <sup>1</sup>H et 100 MHz en <sup>13</sup>C). Les déplacements chimiques sont exprimés en partie par million (ppm) par rapport au solvant deutéré dans lequel le spectre a été réalisé. La numérotation des carbones et des protons des molécules ne correspond pas toujours à la nomenclature et est attribuée de façon arbitraire. Les abréviations utilisées pour décrire les signaux sont :

- s : singulet
- se : singulet élargi
- d : doublet
- dd : doublet dédoublé
- ddd : doublet dédoublé dédoublé
- t : triplet
- td : triplet dédoublé
- m : multiplet

Les spectres de masse ont été réalisés sur un appareil de type Micromass Q-TOF micro équipé d'une source d'ionisation electrospray (ESI)

## Méthodes

### Synthèse du (3*S*,4*R*)-1,3,4-trihydroxypentan-2-one (5-déoxy-D-xylulose) **1**



Formule Brute : C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>  
Masse moléculaire : 134,13

#### **Méthode 1 (TK)**

Le D,L-lactaldéhyde diméthyl acétal **16** (1 g ; 8 mmol) est solubilisé dans 27 mL d'eau distillée. Après avoir ajouté 13 mL de résine Dowex 50WX8 H<sup>+</sup> (200-400 mesh), le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant une nuit. Après hydrolyse de l'acétal, la résine est éliminée par filtration sur fritté. Au filtrat ainsi obtenu sont ajoutés 19 mg (0,04 mmol) de thiamine pyrophosphate, 44mg (0,22 mmol) de MgCl<sub>2</sub>, 6 H<sub>2</sub>O et 830mg d'hydroxypyruvate de lithium **10** (HPA) (pur à 62% ; 5 mmol). Le pH est ajusté à 7,5 par ajout de NaOH 1N. Le milieu réactionnel est maintenu à pH 7,5 au moyen d'un pHstat (ajout de HCl 0,5N). La réaction est initiée par ajout de 30 unités de transcétolase de *S. cerevisiae* (sous forme d'extrait liquide brut). La réaction est suivie par dosage du HPA (dosage enzymatique par la lactate déshydrogénase) et par CCM.

Après consommation totale du HPA, 3 volumes de MeOH sont ajoutés au milieu réactionnel avant de centrifuger à 8000 tours.min<sup>-1</sup> pendant 15 minutes. Le surnageant est filtré, puis évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice éclair (dichlorométhane / méthanol : 9 / 1). Une deuxième purification est effectuée par chromatographie sur gel de silice éclair (cyclohexane / acétate d'éthyle : 4 / 6). Le 5-déoxy-D-xylulose **1** (164 mg ; 1,22 mmol) est obtenu sous forme d'une huile visqueuse avec un rendement de 31 %.

#### **Méthode 2 (FDPA)**

Une solution aqueuse de DHAP **15** à 40 mM (1,9 mmol – 45 mL) tamponnée à pH 7,5 (triéthanolamine 50 mM) est ajoutée lentement à une solution d'acétaldéhyde (209 mg ; 4,74 mmol) dans le DMF (2 mL). Le pH est contrôlé et ajusté à pH 7,5 par NaOH 3N. La réaction est initiée par ajout de 300 unités de RAMA (la RAMA a été centrifugée, puis solubilisée dans du tampon TEA 100 mM pH 7,5). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation, à température ambiante, sous atmosphère inerte.

Après consommation totale du DHAP (dosage enzymatique par la  $\alpha$ -GPDH), le pH du milieu réactionnel est ajusté à 4,8 et 250 mg de phosphatase acide (100 unités) sont ajoutés. L'hydrolyse du phosphate est achevée au bout de 24 heures (suivi par RMN du  $^{31}\text{P}$ ). Trois volumes de MeOH sont ajoutés au milieu réactionnel avant de centrifuger à 8000 tours.min<sup>-1</sup> pendant 15 minutes. Le surnageant est filtré, puis évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice éclair (cyclohexane / acétate d'éthyle : 4 / 6). Le 5-déoxy-D-xylulose **1** (43 mg ; 0,32 mmol) est obtenu sous forme d'une huile visqueuse avec un rendement de 17 %.

### **Méthode 3 (FSA)**

A 660 mg (15 mmol) d'acétaldéhyde, on ajoute 100 mL d'eau distillée. Le pH de la solution obtenue est ajusté à 7,6 par ajout de soude 3N. On ajoute ensuite 450 mg (5 mmol) de dihydroxyacétone et le pH est à nouveau ajusté à 7,6. La réaction est initiée par ajout de 250 unités de FSA mutée A129S (sous forme d'extrait brut lyophilisé). On laisse sous agitation douce pendant une nuit. La réaction est suivie par CCM (dichlorométhane/ méthanol : 85 / 15 + acide acétique 1%).

Après consommation totale du HPA, 3 volumes de MeOH sont ajoutés au milieu réactionnel avant de centrifuger à 8000 tours.min<sup>-1</sup> pendant 15 minutes. Le surnageant est filtré, puis évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice éclair (dichlorométhane / méthanol : 95 / 5). Le 5-déoxy-D-xylulose **1** (660 mg ; 3,53 mmol) est obtenu sous forme d'une huile visqueuse avec un rendement de 71 %.

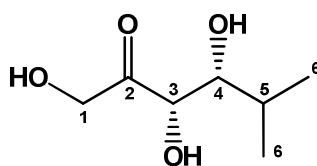
**CCM** : R<sub>f</sub> (dichlorométhane / méthanol : 9 / 1) = 0,27 (vanilline)

**RMN  $^1\text{H}$**  (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 1,23 (3H ; d ; J<sub>5-4</sub> = 6,4 Hz ; H<sub>5</sub>) ; 4,05 (1H ; s ; H<sub>3</sub>) ; 4,09 (1H ; d ; J = 6.4 Hz ; H<sub>4</sub>) ; 4,53 (1H ; d ; J = 19.2 ; H1a) ; 4,43 (1H ; d ; J = 19,4 ; H1b)

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 20,14 (C<sub>5</sub>) ; 68,54 (C<sub>1</sub>) ; 70,21 (C<sub>4</sub>) ; 81,1 (C<sub>3</sub>) ; 214,08 (C<sub>2</sub>)

**HRMS**: m/z : (M+Na)<sup>+</sup> théorique : 157,0477 ; mesuré : 157,0467 (composé obtenu par la méthode 1)

## Synthèse du (3*S*,4*R*)-1,3,4-trihydroxy-5-methylhexan-2-one 2



Formule Brute : C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>  
Masse moléculaire : 162,18

A 1g (4,8 mmol) du composé 23 sont ajoutés 15 mL de THF et 5 mL de HCl 1M. On laisse sous agitation à 50 °C pendant 20 heures. La réaction est suivie par CCM (cyclohexane / acétate d'éthyle : 8 / 2 ; vanilline). Une fois la réaction terminée, 2,4 mL de DMF sont ajoutés et le THF est évaporé sous pression réduite. La solution d'aldéhyde 24 ainsi obtenue est ajustée à pH 7 par ajout d'une solution de NaOH 6N et de l'eau distillée est ajoutée jusqu'à un volume de 15 mL. Une solution de 5 mL contenant du HPA 10 (465 mg ; 2,9 mmol ; pur à 68 %), du MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (14,6 mg ; 71 μmol) et du pyrophosphate de thiamine (2,2 mg ; 4,8 μmol) est ensuite ajoutée. Après le mélange des deux solutions, le pH est ajusté à 7 par ajout d'une solution de NaOH 6N, puis la réaction est initiée par ajout de 20 unités de transcétolase de *S. cerevisiae* (sous forme d'extrait liquide brut). Le milieu réactionnel est maintenu à pH 7,5 au moyen d'un pHstat (ajout de HCl 0,5 N). La réaction est suivie par dosage du HPA (dosage enzymatique par la lactate déshydrogénase) et par CCM (cyclohexane/acétate d'éthyle : 3/7).

Après consommation totale du HPA, 3 volumes de MeOH sont ajoutés au milieu réactionnel avant de centrifuger à 8000 tours.min<sup>-1</sup> pendant 15 minutes. Le surnageant est filtré, puis évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice éclair (cyclohexane / acétate d'éthyle : 4 / 6).

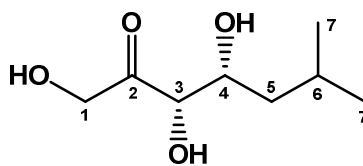
Le composé 2 (20 mg ; 123 μmol) est obtenu sous forme d'une huile avec un rendement de 2,5 %

**CCM** : R<sub>f</sub> (cyclohexane / acétate d'éthyle : 3 / 7) = 0,29 (vanilline)

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 0,90 (3H ; d ; J = 6,7 Hz ; H<sub>6</sub>) ; 0,97 (3H ; d ; J = 6,7 Hz ; H<sub>6'</sub>) ; 1,84 (1H ; od ; J = 2 Hz ; 6,7 Hz ; H<sub>5</sub>) ; 3,37 (3H ; se ; 3OH) ; 3,45 (1H ; d ; J = 8,8 Hz ; H<sub>3</sub>) ; 4,29 (1H ; m ; H<sub>4</sub>) ; 4,38 (1H ; d ; J = 19,2 Hz ; H<sub>1</sub>) ; 4,51 (1H ; d ; J = 19,2 Hz ; H<sub>1'</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 17,8 (C<sub>6</sub>) ; 30,1 (C<sub>5</sub>) ; 65,3 (C<sub>1</sub>) ; 75,2 (C<sub>4</sub>) ; 76,8 (C<sub>3</sub>) ; 211,1 (C<sub>2</sub>).

### Synthèse du (3*S*,4*R*)-1,3,4-trihydroxy-6-méthylheptane-2-one **3**



Formule Brute : C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>  
Masse moléculaire : 176,21

#### Méthode 1 (TK)

A 300 mg (1,3 mmol) du composé (*R*)-**28**, sont ajoutés 13 mL de THF et 13 mL de HCl 1M. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à 40 °C pendant 15 heures. La réaction est suivie par CCM (cyclohexane/acétate d'éthyle : 8/2 ; vanilline).

Une fois la réaction terminée, 750 µL de DMF sont ajoutés. Le THF et une partie de l'eau sont évaporés sous pression réduite jusqu'à un volume de 10 mL. Le pH est ajusté à 7 par ajout de NaOH 6N. Une solution de 3 mL contenant du HPA **10** (292 mg ; 1,8 mmol ; pur à 68 %), du MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (9,1 mg ; 45 µmol) et du pyrophosphate de thiamine (1,2 mg ; 3 µmol) est ajouté. Après le mélange des deux solutions, le pH est ajusté à 7 par ajout d'une solution de NaOH 6N, puis la réaction est initiée par ajout 20 unités de transcétolase de *S. cerevisiae* (sous forme d'extrait liquide brut). Le milieu réactionnel est maintenu à pH 7,5 au moyen d'un pHstat (ajout de HCl 0,5N). La réaction est suivie par dosage du HPA (dosage enzymatique par la lactate déshydrogénase) et par CCM (cyclohexane/acétate d'éthyle : 3/7).

Après consommation totale du HPA, 3 volumes de MeOH sont ajoutés au milieu réactionnel avant de centrifuger à 8000 tours.min<sup>-1</sup> pendant 15 minutes. Le surnageant est filtré, puis évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice éclair (cyclohexane / acétate d'éthyle : 4 / 6).

Le composé **3** (50 mg ; 284 µmol) est obtenu sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 22 %.

#### Méthode 2 (TK)

On solubilise 60 mg du composé (*R*)-**29**, obtenu par déprotection en présence de TBAF, dans 500 µL de DMF. On ajoute ensuite 8,5 mL d'une solution contenant de HPA **10** (94 mg ; 0,6 mmol ; pur à 68 %), du MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (6 mg ; 30 µmol) et du pyrophosphate de thiamine (1mg ; 2.5µmol). On ajuste le pH à 7 avec une solution de NaOH 6N, puis on ajoute 20 unités de transcétolase de *S. cerevisiae* (sous forme d'extrait liquide brut). Le milieu réactionnel est maintenu à pH 7,5 au moyen d'un pHstat (ajout de HCl 0,1N). La réaction est

suivi par dosage du HPA (dosage enzymatique par la lactate déshydrogénase) et par CCM (cyclohexane / acétate d'éthyle : 3 / 7).

Après consommation totale du HPA, le milieu réactionnel est saturé par ajout de NaCl, et extrait 10 fois avec 10 mL d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont regroupées et séchées sur MgSO<sub>4</sub> avant d'être évaporées sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice éclair (dichlorométhane / méthanol : 95 / 5).

Le composé **3** (43 mg ; 240 µmol) est obtenu sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 48 %.

### **Méthode 3 (FDPA)**

Une solution aqueuse de DHAP **15** à 125mM (2,52 mmol) tamponnée à pH 7,5 (triéthanolamine 125 mM) est ajoutée lentement à une solution d'isovaléraldéhyde (680 µL ; 6,3 mmol) dans le DMF (5 mL). Le pH est contrôlé et ajusté à pH 7,5 par NaOH 3N. La réaction est initiée par ajout de 250 unités de RAMA (la RAMA a été centrifugée, puis solubilisée dans du tampon TEA 100 mM pH 7,5). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation, à température ambiante, sous atmosphère inerte. Après consommation totale du DHAP (dosage enzymatique par la α-GPDH), le pH du milieu réactionnel est ajusté à 4,8 et on ajoute 250 mg de phosphatase acide (100 unités). L'hydrolyse du phosphate est achevée au bout de 24 heures (suivi par RMN du <sup>31</sup>P). Trois volumes de MeOH sont ajoutés au milieu réactionnel avant de centrifuger à 8000 tours.min<sup>-1</sup> pendant 15 minutes. Le surnageant est filtré, puis évaporé sous pression réduite. Le surnageant est filtré, puis évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice éclair (cyclohexane / acétate d'éthyle : 1 / 1). Nous obtenons alors 156,6 mg de produit pur (rendement global = 25 %).

### **Méthode 4 (FSA)**

A 1,44 g (16,7 mmol) d'isovaléraldéhyde, on ajoute 112 mL d'eau distillée. Le pH de la solution obtenue est ajusté à 7,6 par ajout de soude 3N. On ajoute ensuite 500 mg (5,6 mmol) de dihydroxyacétone et le pH est à nouveau ajusté à 7,6. La réaction est initiée par ajout de 300 unités de FSA mutée A129S (sous forme d'extrait brut lyophilisé). On laisse sous agitation douce pendant une nuit. La réaction est suivie par CCM (dichlorométhane / méthanol : 9 / 1).

Après consommation totale de la dihydroxyacétone, on ajoute 350 mL de méthanol et on centrifuge le mélange à 8000 tours.min<sup>-1</sup> pendant 15 minutes. Le surnageant est filtré, puis

on évapore le méthanol sous pression réduite. La solution aqueuse résiduelle est saturée avec du NaCl et extraite en continu avec de l'éther pendant une nuit.

Après extraction, la phase organique est évaporée sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice éclair (gradient dichlorométhane / méthanol : 97 / 3 à 9 / 1). On obtient le produit (760 mg ; 4,31 mmol) sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 77 %.

**CCM** : R<sub>f</sub> (dichlorométhane / méthanol : 95 / 5) = 0,27 (vanilline)

R<sub>f</sub> (cyclohexane / acétate d'éthyle : 3 / 7) = 0,48 (vanilline)

$[\alpha]_D^{21} = -8^\circ$  (c = 1,2 ; MeOH)

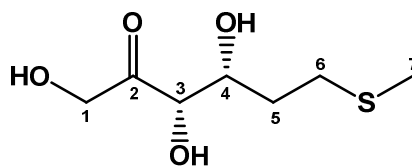
**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 0,94 (3H ; d ; J<sub>7a-6</sub> = 7,7 Hz ; H<sub>7a</sub>) ; 0,96 (3H ; d ; J<sub>7b-6</sub> = 7,7 Hz ; H<sub>7b</sub>) ; 1,35 (1H ; ddd ; J = 4,8 Hz ; 8,4 Hz ; 14 Hz ; H<sub>5a</sub>) ; 1,54 (1H ; ddd ; J = 5,6 Hz ; 8,6 Hz ; 14 Hz ; H<sub>5b</sub>) ; 1,76 (1H ; m ; H<sub>6</sub>) ; 3,99 (1H ; ddd ; J = 2,4 Hz ; 4,8 Hz ; 8,6 Hz ; H<sub>4</sub>) ; 4,09 (1H ; d ; J = 2,4 Hz ; H<sub>3</sub>) ; 4,41-4,46 (1H ; d ; J = 19,2 Hz ; H<sub>1a</sub>) ; 4,51-4,56 (1H ; d ; J = 19,2 Hz ; H<sub>1b</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 21,9 (C<sub>7</sub>) ; 23,6 (C<sub>7</sub>) ; 25,0 (C<sub>6</sub>) ; 41,4 (C<sub>5</sub>) ; 67,3 (C<sub>1</sub>) ; 71,0 (C<sub>4</sub>) ; 79,1 (C<sub>3</sub>) ; 213,9 (C<sub>2</sub>).

**HRMS** : m/z : (M+Na)<sup>+</sup> théorique : 199,0946 ; mesuré : 199,0957 (composé obtenu par la méthode 1)



## Synthèse du (3*S*,4*R*)-1,3,4-trihydroxy-6-(methylthio)hexan-2-one 4



Formule Brute : C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>S  
Masse moléculaire : 194,25

### Méthode 1 : (TK - aldéhyde racémique)

À 1,5 g du composé *rac*-33 (6 mmol) sont ajoutés 75 mL d'eau distillée et 8 g de Dowex H<sup>+</sup>. La réaction est suivie par CCM (cyclohexane / acétate d'éthyle : 5 / 5 ; vanilline). Après 24 heures sous agitation à 30 °C, la résine est éliminée par filtration sur filtre Millipore. Le filtrat est neutralisé par ajout d'une solution de NaOH 3N et le volume est réduit à 20 mL par évaporation de l'eau sous pression réduite. A la solution obtenue sont ajoutés 660 mg de HPA 10 (3,6 mmol ; pur à 60 %), 3 mg de thiamine pyrophosphate (0,006 mmol) et 18,3 mg de MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (0,09 mmol) préalablement dissous dans 9 mL d'eau distillée et ajusté à pH 7. La réaction est initiée par ajout de 60 unités de transcétolase de *S. cerevisiae* (sous forme d'extrait liquide brut). Le pH du milieu réactionnel est maintenu à 7 au moyen d'un pHstat. La réaction est suivie par dosage du HPA (dosage enzymatique par la lactate déshydrogénase) et par CCM (cyclohexane / acétate d'éthyle : 2 / 8).

Après consommation totale du HPA, 3 volumes de MeOH sont ajoutés au milieu réactionnel, puis on centrifuge le mélange à 8000 tours.min<sup>-1</sup> pendant 15 minutes. Le surnageant est filtré, puis évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice éclair (gradient cyclohexane / acétate d'éthyle : 7 / 3 à 3 / 7).

Le produit obtenu est repurifié par cristallisation afin d'éliminer les traces d'aldéhyde de départ : dans un bécher placé dans un bain de glace, le produit est solubilisé dans un minimum de dichlorométhane et 4 volumes de cyclohexane sont lentement ajoutés. Après cristallisation, le composé 4 est récupéré par filtration sur filtre Millipore. Le composé 4 (275 mg ; 1,43 mmol) est obtenu sous forme de cristaux blancs avec un rendement de 23 %.

### Méthode 2 (TK – aldéhyde R)

À 250 mg du composé 32 (1mmol) sont ajoutés 4 mL d'eau distillée et 500 mg de Dowex H<sup>+</sup>. Après 24 heures de réaction sous agitation à 30 °C, la résine est éliminée par filtration sur fritté et rincé 3 fois avec 1 mL d'eau distillée. Le pH du filtrat est ajusté à 7 par ajout de NaOH 3N. A la solution obtenue sont ajoutés 189 mg de HPA 10 (1,2 mmol ; pur à 70 %), 1 mg de thiamine pyrophosphate (0,002 mmol) et 6,1 mg de MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (0,03 mmol) préalablement dissous dans 2 mL d'eau distillée et ajusté à pH 7. La réaction est initiée par

jout de 20 unités de transcétolase de *S. cerevisiae* (sous forme d'extrait liquide brut). Le pH du milieu réactionnel est maintenu à 7 au moyen d'un pHstat. La réaction est suivie par dosage du HPA (dosage enzymatique par la lactate déshydrogénase) et par CCM (cyclohexane / acétate d'éthyle 2 / 8) ; Après consommation totale du HPA, 3 volumes de MeOH sont ajoutés au milieu réactionnel, puis on centrifuge le mélange à 8000 tours.min<sup>-1</sup> pendant 15 minutes. Le surnageant est filtré, puis évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice éclair (gradient dichlorométhane / méthanol : 95 / 5 à 9 / 1). Le composé **4** (67 mg ; 0,35 mmol) est obtenu sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 35 %.

### **Méthode 3 (FSA)**

A 1,74 g (16,7 mmol) de 3-méthyl-thiopropionaldéhyde, on ajoute 110 mL d'eau distillée et on ajuste le pH à 1 par ajout de HCl concentré. On laisse le milieu réactionnel à 115 °C pendant 2 heures sous très vive agitation. Le pH de la solution obtenue est ajusté à 7,6 par ajout de soude 3N. On ajoute ensuite 500 mg (5,6 mmol) de dihydroxyacétone et le pH est à nouveau ajusté à 7,6. La réaction est initiée par ajout de 250 unités de FSA mutée A129S (sous forme d'extrait brut lyophilisé). On laisse sous agitation douce pendant une nuit. La réaction est suivie par CCM (dichlorométhane / méthanol : 9 / 1).

Après consommation totale de la dihydroxyacétone, on ajoute 350 mL de méthanol et on centrifuge le mélange à 8000 tours.min<sup>-1</sup> pendant 15 minutes. Le surnageant est filtré, puis on évapore sous pression réduite. Le résidu est repris par 50 mL de méthanol sous vive agitation. On filtre les sels insolubles et on évapore à nouveau sous pression réduite. Le résidu est repris par 10 mL de méthanol, puis on ajoute 10 mL de dichlorométhane et on filtre à nouveau. On évapore sous pression réduite et le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice éclair (gradient dichlorométhane / méthanol : 95 / 5 à 9 / 1). Le produit (722 mg ; 3,76 mmol) est obtenu sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 67 %.

**CCM** : R<sub>f</sub> (cyclohexane / acétate d'éthyle : 2 / 8) = 0,45 (vanilline)

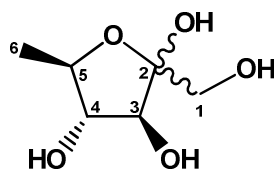
**[α]<sub>D</sub><sup>21</sup>** = + 6,8° (c = 1,56 ; MeOH)

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 1,84 (2H ; m ; H<sub>5</sub>) ; 2,09 (3H ; s ; H<sub>7</sub>) ; 2,59 (2H ; m ; H<sub>6</sub>) ; 4,05 (1H ; ddd ; J = 2,3 ; 5,0 et 7,8 Hz ; H<sub>4</sub>) ; 4,15 (1H ; d ; J = 2,3 Hz ; H<sub>3</sub>) ; 4,43 (1H ; d ; J = 19,2 Hz ; H<sub>1b</sub>) ; 4,53 (1H ; d ; J = 19,2 Hz ; H<sub>1b</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 15,3 (C<sub>7</sub>) ; 31,32 (C<sub>5</sub>) ; 33,73 (C<sub>6</sub>) ; 67,9 (C<sub>1</sub>) ; 72,2 (C<sub>4</sub>) ; 79,4 (C<sub>3</sub>) ; 213,5 (C<sub>2</sub>).

**HRMS**: m/z : (M+Na)<sup>+</sup> théorique : 217,0511 ; mesuré : 217,0501 (composé méthode 1)

## Synthèse du (3*S*,4*R*,5*R*)-2-(hydroxyméthyl)-5-méthyltétrahydrofuran-2,3,4-triol 5



Formule Brute :  $C_6H_{12}O_5$   
Masse Moléculaire : 164,16

À 600 mg du composé **36** (3,1 mmol) sont ajoutés 18,6 mL d'eau distillée et 3,1 g de Dowex  $H^+$ . La réaction est suivie par CCM (pentane / éther : 99 / 1 ;  $KMnO_4$ ). Après 12 heures de réaction à 30 °C, la résine est éliminée par filtration sur verre fritté et rincée avec un minimum d'eau. Le volume du filtrat est amené à 62 mL par ajout d'eau distillée et le pH est ajusté à 7,6 par ajout de soude 3N. 280 mg (3,1 mmol) de dihydroxyacétone sont ajoutés et le pH est à nouveau ajusté à 7,6. La réaction est initiée par ajout de 420 unités de FSA mutée A129S (sous forme d'extrait brut lyophilisé). On laisse sous agitation douce pendant une nuit. La réaction est suivie par CCM (dichlorométhane / méthanol : 9 / 1).

Après consommation totale de la dihydroxyacétone, on ajoute 200 mL de méthanol et on centrifuge le mélange à 8000 tours.min<sup>-1</sup> pendant 15 minutes. Le surnageant est filtré, puis évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice éclair (dichlorométhane / méthanol : 9 / 1). On obtient le produit (280 mg ; 1,7 mmol) sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 55 %.

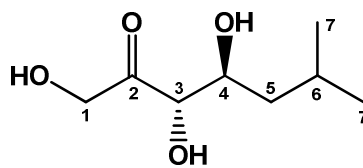
**CCM** :  $R_f$  (dichlorométhane / méthanol : 9 / 1) = 0,3 (vanilline)

**RMN  $^1H$**  (400 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  : 1,21 (3H ; d ;  $J = 6,4$  Hz ;  $H_{6\alpha}$ ) ; 1,23 (3H ; d ;  $J = 6,0$  Hz ;  $H_{6\beta}$ ) ; 3,25-3,98 (5H ; m ;  $2H_1 + H_3 + H_4 + H_5$ )

**RMN  $^{13}C$**  (100 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  : 17,4 ( $C_{6\alpha}$ ) ; 18,9 ( $C_{6\beta}$ ) ; 62,8 ( $C_{1\beta}$ ) ; 62,9 ( $C_{1\alpha}$ ) ; 75,1 ; 76,3 ; 76,4 ; 79,4 ; 81,2 ; 82,5 ( $C_{3\alpha+\beta}$  ;  $C_{4\alpha+\beta}$  ;  $C_{5\alpha+\beta}$ ) ; 101,0 ( $C_{2\beta}$ ) ; 103,8 ( $C_{2\alpha}$ )

**HRMS**:  $m/z$  :  $(M+Na)^+$   $m/z$  : théorique : 187,0582 ; mesuré : 187,0579

## Synthèse du (3S,4S)-1,3,4-trihydroxy-6-méthylheptan-2-one 6



Formule Brute : C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>  
Masse moléculaire : 176,21

À 540 mg de composé 41 (2,5 mmol) sont ajoutés 20 mL d'eau distillée et 450 mg de résine DOWEX H<sup>+</sup> 50WX8 (450 mg). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante. La réaction est suivie par CCM (cyclohexane / acétate d'éthyle : 7 / 3 ; vanilline).

Après disparition du composé 41 de départ, le mélange est filtré sur un filtre millipore. Le filtrat est évaporé puis le produit est purifié par recristallisations successives dans le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : le brut réactionnel est solubilisé dans un minimum de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> à 30 °C, puis mis dans un bain de glace ; quand le produit est cristallisé le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> est retiré avec une seringue munie d'une aiguille non biseautée ; l'opération est réalisée trois fois. Le composé 6 (230 mg ; 1,31 mmol) est obtenu sous la forme d'un solide blanc avec un rendement de 52 %.

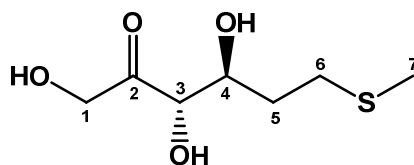
**CCM** : R<sub>f</sub> (AcOEt pur) = 0,6 (vanilline)

$[\alpha]_D^{21} = -35,5^\circ$  (c = 1,07 ; MeOH)

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 0,87 (3H ; d ; J = 6,4 Hz ; H<sub>7</sub>) ; 0,91 (3H ; d ; J = 6,5 Hz ; H<sub>7</sub>) ; 1,19 (1H ; m ; H<sub>5a</sub>) ; 1,44 (1H ; m ; H<sub>5b</sub>) ; 1,79 (1H ; m ; H<sub>6</sub>) ; 3,79 (1H ; m ; H<sub>4</sub>) ; 4,02 (1H ; d ; J = 5,3 Hz ; H<sub>3</sub>) ; 4,36 (1H ; d ; J = 19,4 Hz ; H<sub>1a</sub>) ; 4,47 (1H ; d ; J = 19,4 Hz ; H<sub>1b</sub>)

**RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  : 21,9 (C<sub>7</sub>) ; 24,2 (C<sub>7</sub>) ; 25,3 (C<sub>6</sub>) ; 42,5 (C<sub>5</sub>) ; 68,2 (C<sub>1</sub>) ; 72,2 (C<sub>4</sub>) ; 80,2 (C<sub>3</sub>) ; 213,2 (C<sub>2</sub>)

## Synthèse du (3S,4S)-1,3,4-trihydroxy-6-(methylthio)hexan-2-one 7



Formule Brute :  $C_7H_{14}O_4S$   
Masse moléculaire : 194,25

Le produit **50** (800 mg) est dissout dans un mélange MeOH / H<sub>2</sub>O (10 / 1) et une résine acide est ajouté (Dowex 50WX8 H<sup>+</sup>; 800 mg). La réaction est agitée pendant 18 heures. La résine est filtrée, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (148 mg ; 0,78 mmol ; 0,5 éq) est ajouté puis les solvants sont évaporés. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice flash (dichlorométhane / méthanol : 97 / 3). Le produit est obtenu sous la forme d'une huile incolore (200 mg) avec un rendement de 66 % sur les deux étapes.

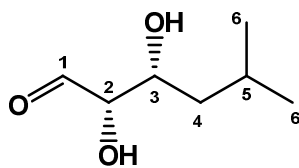
CCM R<sub>f</sub> (dichlorométhane / méthanol : 9 / 1) = 0,5 (vanilline)

**RMN <sup>1</sup>H** (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz)  $\delta$  : 1,78 (2H ; m ; H<sub>6</sub>) ; 2,08 (3H ; s ; H<sub>1'</sub>) ; 2,55 (1H ; m ; H<sub>5a</sub>) ; 2,66 (1H ; m ; H<sub>5b</sub>) ; 3,89 (1H ; m ; H<sub>4</sub>) ; 4,10 (1H ; d ; J = 5,2 Hz ; H<sub>3</sub>) ; 4,42 (1H ; d ; J = 19,6 Hz ; H<sub>1a</sub>) ; 4,52 (1H ; d ; J = 19,2 Hz ; H<sub>1b</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz)  $\delta$  : 15,4 (C<sub>1'</sub>) ; 31,3 (C<sub>5</sub>) ; 33,0 (C<sub>6</sub>) ; 68,1 (C<sub>1</sub>) ; 72,7 (C<sub>4</sub>) ; 79,6 (C<sub>3</sub>) ; 213,0 (C<sub>2</sub>).

**HRMS**: [M+Na] : théorique : 217,0511, obtenue : 217,0522

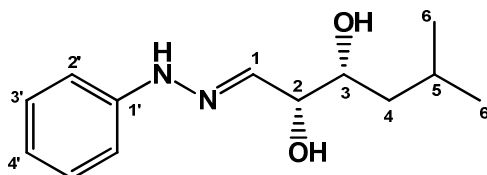
### Synthèse du (2S,3R)-2,3-dihydroxy-5-methylhexanal **8**



Formule Brute :  $C_7H_{14}O_3$   
Masse Moléculaire : 146,18

A 50 mg de composé **57** (260  $\mu$ mol) sont ajoutés 2 mL d'eau distillée et 40 mg de résine Dowex 50WX8 (sous forme  $H^+$ ). La réaction est placée à 40 °C sous agitation. Le suivi de la réaction est réalisé par CCM (cyclohexane / acétate d'éthyle : 2 / 8) et par dosage enzymatique de l'aldéhyde formé (dosage utilisant la « equine liver » alcohol dehydrogenase). Une fois la réaction terminée (concentration finale en aldéhyde : 80 – 90 mM), on filtre la résine et on ajuste le pH à 7 par ajout de NaOH 6N.

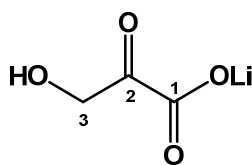
Ce produit sera caractérisé via sa dérivation en phénylhydrazone :



Formule Brute :  $C_{13}H_{18}O_3$   
Masse Moléculaire : 230,26

**RMN  $^1H$**  ( $CD_3OD$ , 400 MHz)  $\delta$  : 0,90 (6H ; 2d ;  $H_6$ ) ; 1,20 (1H ; ddd ;  $H_{4a}$ ) ; 1,49 (1H ; ddd ;  $H_{4b}$ ) ; 1,79 (1H ; m ;  $H_5$ ) ; 3,69 (1H ; t ;  $H_2$ ) ; 4,12 (1H ; t ;  $H_3$ ) ; 6,56 (1H ; d ;  $H_1$ ) ; 7,09 (4H ; d ;  $H_{2'}$ ) ; 7,17 (2H ; t ;  $H_{4'}$ ) ; 7,39 (4H ; t ;  $H_{3'}$ ).

## Synthèse de l'hydroxypyruvate de lithium 10



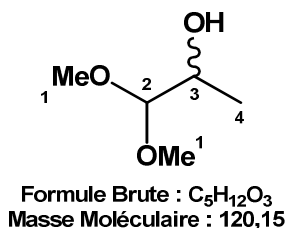
Formule Brute :  $C_3H_3LiO_4$   
Masse Moléculaire : 109,99

Dans un erlenmeyer de 250 mL, sont ajoutés 100 mL d'eau distillée et 10 g (0,06 mol) d'acide bromopyruvique. Au moyen d'un pHstat, le pH est maintenu à 9 par ajout de LiOH 1N. La réaction est terminée quand le pH est stable et qu'il n'y a plus d'ajout de LiOH par le pHstat. Le pH est ajusté à 5 par ajout d'acide acétique pur, puis le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite. Le solide résiduel est repris avec un minimum d'eau glacée et filtré sur verre fritté. Après une nuit en dessiccateur sous vide poussé, le HPA (4,75 g) est obtenu sous la forme d'un solide blanc légèrement jaune. La pureté du HPA (61 %) est déterminée par dosage enzymatique (par la lactate déshydrogénase). Au final, le HPA est obtenu avec un rendement de 72 %.

**RMN  $^1H$**  ( $D_2O$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm) : 3,65 (s ; 2H ;  $H_3$  forme hydrate) ; 4,70 (s ; 2H ;  $H_3$  forme cétonique).

**RMN  $^{13}C$**  ( $D_2O$ , 100 MHz)  $\delta$  (ppm) : 65,3 ( $C_3$  forme hydrate) ; 66,1 ( $C_3$  forme cétonique) ; 94,4 ( $C_2$  forme hydrate) ; 167,5 ( $C_1$  forme hydrate) ; 176,6 ( $C_1$  forme cétonique) ; 202,6 ( $C_2$  forme cétonique).

## Synthèse du D,L-lactaldéhyde diméthylacétal **16**



À 2,85g (80 mmol) de LiAlH<sub>4</sub> dans 50mL d'éther anhydre sont ajoutés lentement (30 min. à 1 heure) 6 g (50 mmol) de pyruvaldéhyde diméthylacétal préalablement solubilisés dans l'éther anhydre (50 mL). Lors de l'addition, le ballon est placé dans un bain de glace. Après l'addition, le bain de glace est retiré et le mélange réactionnel est chauffé 2 heures sous agitation, à reflux de l'éther.

Après consommation du produit de départ, la réaction est arrêtée par addition de 15mL d'une solution de NaCl saturée. On ajoute 75 mL d'éther, puis on filtre le précipité obtenu sur un fritté (avec de la célite). Le précipité est lavé 4 fois avec 25 mL d'éther. Le filtrat obtenu est séché sur MgSO<sub>4</sub>, puis évaporé sous pression réduite.

Le D,L-lactaldéhyde diméthylacétal **16** (4,38 g ; 36,5 mmol) est obtenu sous forme d'un liquide transparent avec un rendement de 73 %.

**CCM** : R<sub>f</sub> (cyclohexane / acétate d'éthyle : 6 / 4) = 0,32 (vanilline)

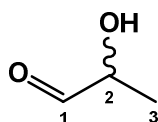
**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 1,3 (3H ; d ; J<sub>3-4</sub> = 6,4 Hz ; H<sub>4</sub>) ; 3,32 (6H ; 2s ; 2 H<sub>1</sub>) ; 3,59 (1H ; m ; H<sub>3</sub>) ; 3,96 (1H ; d ; J = 6,2 et 6,4 Hz ; H<sub>2</sub>)

**RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 18,51 (C<sub>4</sub>) ; 55,75 (C<sub>1</sub>) ; 56,25 (C<sub>1'</sub>) ; 68,87 (C<sub>3</sub>) ; 109,97 (C<sub>2</sub>)

**HRMS** m/z : (M+Na)<sup>+</sup> théorique : 143,0684 ; mesuré : 143,0668.



### Synthèse du D,L-lactaldéhyde 17

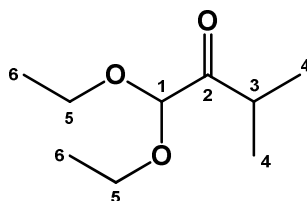


formule brute:  $C_3H_6O_2$   
Masse moléculaire: 74,04

Le D,L-lactaldéhyde diméthyl acétal 16 (1 g ; 8 mmol) est solubilisé dans 27 mL d'eau distillée. Après avoir ajouté 13 mL de résine Dowex 50WX8  $H^+$  (200-400 mesh), le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant une nuit. Après hydrolyse de l'acétal, la résine est éliminée par filtration sur fritté. Le pH est ajusté à 7,5 par ajout de NaOH 1N.

Compte tenue de l'instabilité des aldéhydes  $\alpha$ -hydroxylés en général, ce produit sera utilisé directement en solution pour l'étape suivante et donc caractérisé *via* la réaction avec la TK.

### Synthèse du 1,1-diéthoxy-3-méthylbutan-2-one **18**



Formule Brute :  $C_9H_{18}O_3$

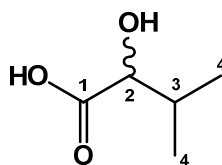
Masse Moléculaire : 174,24

A une solution de diéthoxyacétonitrile (646 mg, 5 mmol) dans 20 mL d'éther anhydre est ajouté goutte à goutte à température ambiante une solution de chlorure d'isopropylmagnésium (2M dans l'éther, 1,5 éq.). La solution est agitée pendant une demi-heure puis refroidie dans un bain eau-glace. 50 mL d'eau sont ajoutés lentement et la solution est extraite avec 2 fois 20 mL d'éther. Les phases organiques sont combinées sur sulfate de magnésium puis concentrées sous vide. Le produit **18** est purifié par chromatographie éclair (cyclohexane / acétone : 100 / 1). 0,819 mg sont obtenus (94 %) sous forme d'une huile incolore.

**RMN  $^1H$**  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  : 1,10 (6H ; d ;  $J = 7$  Hz ;  $H_4$ ) ; 1,25 (6H ; q ;  $J = 7,2$  Hz ;  $H_6$ ) ; 3,07 (1H ; sept ;  $J = 7$  Hz ;  $H_3$ ) ; 3,65 (4H ; m ;  $H_5$ )

**RMN  $^{13}C$**  (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  : 15,25 ( $C_6$ ) ; 18,54 ( $C_4$ ) ; 35,51 ( $C_3$ ) ; 63,13 ( $C_5$ ) ; 101,98 ( $C_1$ ), 209,76 ( $C_2$ ).

## Synthèse de l'acide 2-hydroxy-3-méthylbutanoïque 20



Formule Brute :  $C_5H_{10}O_3$   
Masse Moléculaire : 118,13

Dans un ballon de 500 mL, sont ajoutés 168 mL d'eau distillée et 12 mL de  $H_2SO_4$  concentré à 25 g (0,21 mol) de D,L-Valine . Le ballon est placé dans un bain de glace + sel (0 à  $-5\text{ }^{\circ}C$ ), puis on additionne lentement (30 min à 1 heure) 21,7 g (0,315 mol ; 1,5 eq.) de  $NaNO_2$  solubilisé dans 110 mL d'eau distillée. Après la fin de l'addition, le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 1h30 à  $0\text{ }^{\circ}C$ , puis à température ambiante pendant une nuit. La réaction est suivie par CCM (isopropanol / eau : 7 / 3 ; ninhydrine)

Une fois la réaction terminée, on extrait le milieu réactionnel trois fois avec 200 mL d'éther. Les phases organiques sont regroupées, lavées avec 200 mL d'une solution de NaCl saturée, puis séchées sur  $MgSO_4$  avant d'être évaporées sous pression réduite. Le composé 20 (12,9 g ; 0,109 mmol) est obtenu sous forme de solide blanc avec un rendement de 52 %.

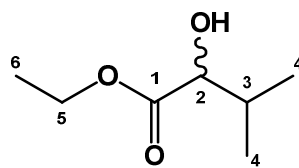
**CCM** :  $R_f$  (isopropanol / eau) = 0,41 (ninhydrine)

**RMN  $^1H$**  (400 MHz, MeOD)  $\delta$  : 0,92 (3H ; d ;  $J = 6,95\text{ Hz}$  ;  $H_{4a}$ ) ; 1,00 (3H ; d ;  $J = 6,77\text{ Hz}$  ;  $H_{4b}$ ) ; 2,05 (1H ; m ;  $J = 4,21$  ; 6,77 et 6,95 Hz ;  $H_3$ ) ; 3,93 (1H ;  $J = 4,21\text{ Hz}$  ;  $H_2$ )

**RMN  $^{13}C$**  (100 MHz, MeOD)  $\delta$  : 16,89 ( $C_{4a}$ ) ; 19,27 ( $C_{4b}$ ) ; 33,17 ( $C_3$ ) ; 76,27 ( $C_2$ ) ; 177,42 ( $C_1$ )

**HRMS** :  $m/z$  :  $(M+Na)^+$  théorique : 141,0528 ; mesuré : 141,0515

## Synthèse du 2-hydroxy-3-methylbutanoate d'éthyle 21



Formule Brute :  $C_7H_{14}O_3$   
Masse Moléculaire : 146,18

À 12 g (0,102 mmol) du composé 20, sont ajoutés 400 mL d'éthanol absolu, 200 mL de chloroforme et 70 g de résine acide Amberlyst<sup>®</sup> 15. Le milieu réactionnel est chauffé à 85 °C sous agitation pendant 48 heures. Les vapeurs étant continuellement condensées à travers du tamis moléculaire activé 4 Å avant de retourner dans le milieu réactionnel. La réaction est suivie par CCM (cyclohexane / acétate d'éthyle : 5 / 5 ; molybdate de cérium).

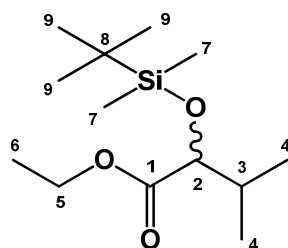
Une fois la réaction achevée, le milieu réactionnel est filtré sur verre fritté (avec célite). Le filtrat obtenu est évaporé sous pression réduite. Le composé 21 (14,1 g ; 96,6 mmol) est obtenu sous forme d'un liquide translucide brunâtre avec un rendement de 95 %.

**CCM** : Rf (cyclohexane / acétate d'éthyle : 5 / 5) = 0,78 (molybdate de cérium)

**RMN  $^1H$**  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  : 0,86 (3H ; d ; J = 6,95 Hz ;  $H_{4a}$ ) ; 1,01 (3H ; d ; J = 6,95 Hz ;  $H_{4b}$ ) ; 1,29 (3H ; t ; J = 7,14 Hz ;  $H_6$ ) ; 2,07 (1H ; m ; J = 3,48 et 6,95 Hz ;  $H_3$ ) ; 2,98 (1H ; s ; OH) ; 4,02 (1H ; d ; J = 3,48 ;  $H_2$ ) ; 4,25 (2H ; t ; J = 7,14 Hz ;  $H_5$ ).

**RMN  $^{13}C$**  (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  : 14,36 ( $C_6$ ) ; 16,06 ( $C_{4a}$ ) ; 18,88 ( $C_{4b}$ ) ; 32,27 ( $C_3$ ) ; 61,69 ( $C_5$ ) ; 75,10 ( $C_2$ ) ; 175,08 ( $C_1$ )

## Synthèse du 2-(tert-butyldiméthylsilyloxy)-3-méthylbutanoate d'éthyle 22



Formule Brute :  $C_{13}H_{28}O_3Si$   
Masse Moléculaire : 260,45

À une solution du composé 21 (13 g ; 89 mmol) et d'imidazole (12 g ; 178mmol ; 2 éq.) dans le  $CH_2Cl_2$  anhydre (300 mL), est ajouté lentement une solution de chlorure de *ter*-butyl-diméthylsilyle (20 g ; 133 mmol ; 1,5 éq.) dans le  $CH_2Cl_2$  anhydre (100 mL). Après l'addition, le milieu réactionnel est laissé une nuit sous agitation à reflux du  $CH_2Cl_2$ . La réaction est suivie par CCM (cyclohexane / acétate d'éthyle : 9 / 1).

Une fois la réaction achevée, le milieu réactionnel est lavé trois fois avec 100 mL d'une solution saturée de NaCl. La phase organique est séchée sur  $MgSO_4$ , puis évaporée sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice éclair (cyclohexane / acétate d'éthyle : 98 / 2). Le composé 22 (19,35g ; 74,4mmol) est obtenu sous forme d'un liquide translucide avec un rendement de 84 %.

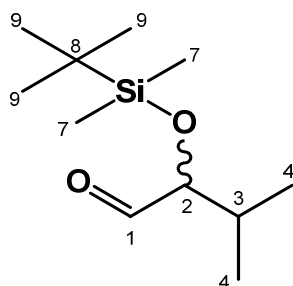
**CCM** :  $R_f$  (cyclohexane / acétate d'éthyle : 9 / 1) = 0,79 (molybdate cérique)

**RMN  $^1H$**  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  : 0,03 (3H ; s ;  $H_{7a}$ ) ; 0,05 (3H ; s ;  $H_{7b}$ ) ; 0,89 (3H ; d ;  $J$  = 6,77 Hz ;  $H_{4a}$ ) ; 0,91 (9H ; s ;  $H_9$ ) ; 0,93 (3H ; d ;  $J$  = 6,95 ;  $H_{4b}$ ) ; 1,27 (3H ; t ;  $J$  = 7,14 Hz ;  $H_6$ ) ; 2,03 (1H ; m ;  $H_3$ ) ; 3,94 (1H ; d ;  $J$  = 4,94 ;  $H_2$ ) ; 4,17 (2H ; d ;  $J$  = 7,14 Hz ;  $H_5$ ).

**RMN  $^{13}C$**  (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  : - 5,23 ( $C_{7a}$ ) ; - 4,81 ( $C_{7b}$ ) ; 14,41 ( $C_6$ ) ; 17,07 ( $C_{4a}$ ) ; 18,46 ( $C_8$ ) ; 19,17 ( $C_{4b}$ ) ; 25,79 ( $C_9$ ) ; 32,97 ( $C_3$ ) ; 60,55 ( $C_5$ ) ; 77,23 ( $C_2$ ) ; 173,67 ( $C_1$ )

**HRMS** :  $m/z$  :  $(M+Na)^+$  théorique : 283,1705 ; mesuré : 283,1701.

### Synthèse du 2-(tert-butyldimethylsilyloxy)-3-methylbutanal **23**



**Formule Brute : C<sub>11</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub>Si**  
**Masse Moléculaire : 216,39**

À une solution du composé **22** (8 g ; 30,8 mmol) dans le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhydre (250 mL) placée à – 78 °C est lentement ajouté 31 mL d'une solution d'hydrure de diisobutylaluminium à 1M dans le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (31 mmol ; 1,3 éq.). Le milieu réactionnel est laissé à – 78 °C sous agitation pendant 1h30. La réaction est suivie par CCM (cyclohexane / acétate d'éthyle 98 / 2)

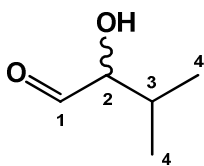
Une fois la réaction achevée, 100 mL de méthanol sont ajoutés au milieu réactionnel. Après retour à température ambiante, 200 mL d'une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub> sont ajoutés et le milieu réactionnel est laissé sous vive agitation durant une heure, puis 100 mL d'une solution saturée de NaCl sont ajoutés. L'extraction est réalisée trois fois avec 150 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Les phases organiques sont regroupées et séchées sur MgSO<sub>4</sub> avant d'être évaporées sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice éclair (cyclohexane / acétate d'éthyle 95 / 5). Le composé **23** (5,97 g ; 27,64 mmol) est obtenu sous forme d'un liquide translucide avec un rendement de 90 %.

**CCM** : R<sub>f</sub> (cyclohexane / acétate d'éthyle 95 / 5) = 0,62 (vanilline et molybdate cérique)

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 0,052 (6H ; s ; H<sub>5</sub>) ; 0,91 – 0,92 (12H ; m ; H<sub>4a</sub> et H<sub>7</sub>) ; 0,96 (3H ; d ; J = 6,95 Hz ; H<sub>4b</sub>) ; 2,02 (1H ; J = 4,94 ; 6,77 et 6,95 Hz ; H<sub>3</sub>) ; 3,71 (1H ; dd ; J = 2,20 et 4,94 ; H<sub>2</sub>) ; 9,59 (1H ; d ; J = 2,4 Hz ; H<sub>1</sub>)

**RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : – 4,93 (C<sub>5a</sub>) ; – 4,40 (C<sub>5b</sub>) ; 16,96 (C<sub>4a</sub>) ; 18,39 (C<sub>6</sub>) ; 18,84 (C<sub>4b</sub>) ; 25,91 (C<sub>7</sub>) ; 31,65 (C<sub>3</sub>) ; 82,18 (C<sub>2</sub>) ; 205,08 (C<sub>1</sub>)

### Synthèse du 2-hydroxy-3-méthylbutanal 24

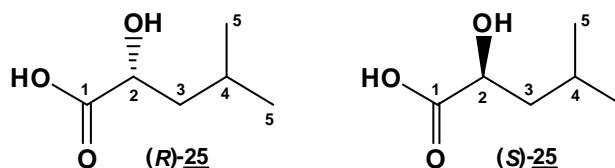


formule brute:  $C_5H_{10}O_2$   
Masse moléculaire: 102,07

A 1 g (4,8 mmol) du composé 23 sont ajoutés 15 mL de THF et 5 mL de HCl 1M. On laisse sous agitation à 50 °C pendant 20 heures. La réaction est suivie par CCM (cyclohexane / acétate d'éthyle : 8 / 2 ; vanilline). Une fois la réaction terminée, 2,4 mL de DMF sont ajoutés et le THF est évaporé sous pression réduite. La solution d'aldéhyde 24 ainsi obtenu est ajustée à pH 7 par ajout d'une solution de NaOH 6N.

Compte tenue de l'instabilité des aldéhydes  $\alpha$ -hydroxylés en général, ce produit sera utilisé directement en solution pour l'étape suivante et donc caractérisé *via* la réaction avec la TK.

## Synthèse de l'acide 2-hydroxyisocaproïque (*R*)-25 et (*S*)-25



Formule Brute :  $C_6H_{12}O_3$   
Masse Moléculaire : 132,16

Dans un ballon de 1 L, on dissout 10 g (76,3 mmol) de D-leucine (dans le cas du composé (*R*)-25) ou L-leucine (dans le cas du composé (*S*)-25) dans un mélange de 291,5 mL d'eau distillée et 8,5 mL d'acide sulfurique concentré. On place le ballon sous agitation dans un bain de glace. On additionne lentement (2 à 3 heures) une solution de nitrite de sodium (31,6 g ; 0,46 mol ; 100 mL d'eau). Une fois l'addition terminée, on laisse la réaction remonter à température ambiante, puis on laisse sous agitation pendant 20 heures. La réaction est suivie par CCM (isopropanol / eau : 7 / 3 ; ninhydrine)

Une fois la réaction terminée, le milieu réactionnel est extrait une fois avec 250 mL, puis deux fois 125 mL d'éther. Les phases organiques sont réunies, lavées deux fois avec 50 mL d'une solution saturée de NaCl, séchées sur  $MgSO_4$ , puis évaporées sous pression réduite. Le solide blanc obtenu est lavé au pentane, puis séché sous vide. Le composé (*R*)-25 (6,25 g ; 47,3 mmol) est obtenu sous la forme d'un solide blanc avec un rendement de 62 %. Le composé (*S*)-25 (8,2 g ; 62,1 mmol) est obtenu sous la forme d'un solide blanc avec un rendement de 81 %.

**CCM** :  $R_f$  (isopropanol / eau : 7 / 3) = 0,75 (ninhydrine)

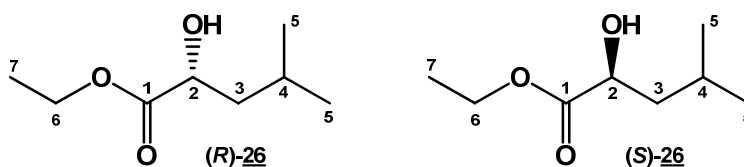
$[\alpha]_D^{21}$  = (*R*)-25 : + 26,1° (c = 1 ; NaOH 1N) ; (*S*)-25 : - 26,4° (c = 1,1 ; NaOH 1N)

**RMN  $^1H$**  (400 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  : 0,97 (6H ; d ; J = 6,6 Hz ;  $H_5$ ) ; 1,62 (2H ; dd ; J = 5,7 Hz ; 7,4 Hz ;  $H_3$ ) ; 1,92 (1H ; m ;  $H_4$ ) ; 4,29 (1H ; t ; J = 5,7 Hz ;  $H_2$ )

**HRMS** : m/z : ( $M+Na$ )<sup>+</sup> théorique : 155,0684 ; mesuré : 155,0674



## Synthèse du 2-hydroxy-4-méthylpentanoate d'éthyle (*R*)-**26** et (*S*)-**26**



Formule Brute :  $C_8H_{16}O_3$   
Masse Moléculaire : 160,21

À 5 g (37,9 mmol) du composé (*R*)-**25** ou (*S*)-**25**, sont ajoutés 300 mL d'éthanol absolu, 200 mL de chloroforme et 4 g de résine acide Amberlyst<sup>®</sup> 15. Le milieu réactionnel est chauffé à 90 °C sous agitation pendant 24 heures. Les vapeurs étant continuellement condensées à travers du tamis moléculaire activé 4 Å avant de retourner dans le milieu réactionnel. La réaction est suivie par CCM (cyclohexane / acétate d'éthyle : 6 / 4 ; molybdate de cérium).

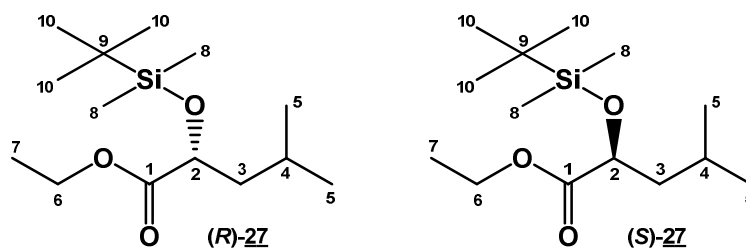
Une fois la réaction achevée, le milieu réactionnel est filtré sur verre fritté (avec célite). Le filtrat obtenu est évaporé sous pression réduite. Le composé (*R*)-**26** (5,95 g ; 36,6 mmol) est obtenu sous la forme d'un liquide translucide brunâtre avec un rendement de 97 %. Le composé (*S*)-**26** (6 g ; 37,5 mmol) est obtenu sous la forme d'un liquide translucide brunâtre avec un rendement de 99 %.

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  : 0,91 (3H ; d ;  $J = 6,8$  Hz ;  $H_{5a}$ ) ; 0,93 (3H ; d ;  $J = 6,8$  Hz ;  $H_{5b}$ ) ; 1,25 (3H ; t ;  $J = 7,1$  Hz ;  $H_7$ ) ; 1,48 (2H ; m ;  $H_3$ ) ; 1,86 (1H ; m ;  $H_4$ ) ; 2,67 (1H ; s large ; OH) ; 4,15 – 4,25 (3H ; m ;  $H_2$  et  $H_6$ )

**RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  : 14,2 ( $C_7$ ) ; 21,6 ( $C_{5a}$ ) ; 23,2 ( $C_{5b}$ ) ; 24,4 ( $C_4$ ) ; 43,5 ( $C_3$ ) ; 61,6 ( $C_6$ ) ; 69,1 ( $C_2$ ) ; 175,9 ( $C_1$ )

**HRMS:**  $m/z$  :  $(M+Na)^+$  théorique : 183,0997 ; mesuré : 183,1014

## Synthèse du 2-(*ter*butyldiméthylsilyloxy)-4-méthylpentanoate d'éthyle (*R*)-27 et (*S*)-27



Formule Brute :  $C_{14}H_{30}O_3Si$   
Masse Moléculaire : 274,47

À une solution du composé (*R*)-26 (4,8 g ; 30 mmol) et d'imidazole (4,1 g ; 60 mmol ; 2 éq.) dans le  $CH_2Cl_2$  anhydre (100 mL), est ajouté lentement une solution de chlorure de *ter*-butyl-diméthylsilyle (6,8 g ; 42,5 mmol ; 1,5 éq.) dans le  $CH_2Cl_2$  anhydre (50 mL).

À une solution du composé (*S*)-26 (5,5 g ; 34,4 mmol) et d'imidazole (4,7 g ; 68,8 mmol ; 2 éq.) dans le  $CH_2Cl_2$  anhydre (100 mL), est ajouté lentement une solution de chlorure de *ter*-butyl-diméthylsilyle (7,8 g ; 51,6 mmol ; 1,5 éq.) dans le  $CH_2Cl_2$  anhydre (50 mL).

Après l'addition, le milieu réactionnel est laissé une nuit sous agitation à reflux du  $CH_2Cl_2$ . La réaction est suivie par CCM (cyclohexane / acétate d'éthyle : 9 / 1). Une fois la réaction achevée, le milieu réactionnel est lavé trois fois avec 100 mL d'une solution saturée de NaCl. La phase organique est séchée sur  $MgSO_4$ , puis évaporée sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice éclair (cyclohexane / acétate d'éthyle : 98 / 2). Le composé (*R*)-27 (7,41 g ; 27 mmol) est obtenu sous forme d'un liquide translucide avec un rendement de 90 %. Le composé (*S*)-27 (7,7 g ; 28 mmol) est obtenu sous forme d'un liquide translucide avec un rendement de 81 %.

**CCM** :  $R_f$  (cyclohexane / acétate d'éthyle : 98 / 2) = 0,5 (molybdate de cérium)

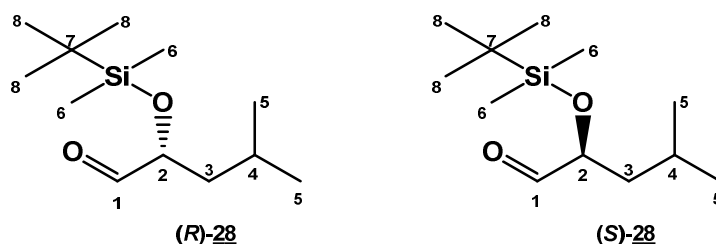
**$[\alpha]_D^{21}$**  : (*R*)-27 : + 36,6° ( $c = 1,4$  ;  $CHCl_3$ ) ; (*S*)-27 : - 37,1° ( $c = 1,2$  ;  $CHCl_3$ )

**RMN  $^1H$**  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  : 0,06 (3H ; s ;  $H_{8a}$ ) ; 0,08 (3H ; s ;  $H_{8b}$ ) ; 0,93-0,96 (15H ; m ;  $H_5$  et  $H_{10}$ ) ; 1,25 (3H ; t ;  $J = 7,1$  Hz ;  $H_7$ ) ; 1,46 (1H ; ddd ;  $J = 3,8$  ; 9,0 et 13,5 Hz ;  $H_{3a}$ ) ; 1,65 (1H ; ddd ;  $J = 5,0$  ; 8,3 et 13,5 Hz ;  $H_{3b}$ ) ; 1,81 (1H ; m ;  $H_4$ ) ; 4,14-4,22 (3H ; m ;  $H_2$  et  $H_6$ )

**RMN  $^{13}C$**  (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  : - 5,4 ( $C_{8a}$ ) ; - 4,8 ( $C_{8b}$ ) ; 14,2 ( $C_7$ ) ; 18,3 ( $C_9$ ) ; 21,6 ( $C_{5a}$ ) ; 23,3 ( $C_{5b}$ ) ; 24,0 ( $C_4$ ) ; 25,6 ( $C_{10}$ ) ; 44,2 ( $C_3$ ) ; 60,6 ( $C_6$ ) ; 70,9 ( $C_2$ ) ; 174,4 ( $C_1$ )

**HRMS** :  $m/z$  :  $(M+Na)^+$  théorique : 297,01862 ; mesuré : 297,1873

## Synthèse du 2-(terbutyldiméthylsilyloxy)-4-méthylpentanal (*R*)-**28** et (*S*)-**28**



Formule Brute : C<sub>12</sub>H<sub>26</sub>O<sub>2</sub>Si  
Masse Moléculaire : 230,42

À une solution du composé (*R*)-**27** ou (*S*)-**27** (2 g ; 7,27 mmol) dans le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhydre (75 mL) placée à – 78 °C, est lentement ajouté 8,7 mL d'une solution d'hydruure de diisobutylaluminium à 1M dans le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8,7 mmol ; 1,2 éq.). Le milieu réactionnel est laissé à – 78 °C sous agitation pendant 2 heures. La réaction est suivie par CCM (cyclohexane / acétate d'éthyle : 98 / 2).

Une fois la réaction achevée, 10 mL de méthanol sont ajoutés au milieu réactionnel. Après retour à température ambiante, 50 mL d'une solution saturée de NH<sub>4</sub>Cl sont ajoutés et le milieu réactionnel est laissé sous vive agitation durant 30 minutes. L'extraction est réalisée trois fois avec 50 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Les phases organiques sont regroupées, lavées avec 100 mL d'une solution saturée de NaCl et séchées sur MgSO<sub>4</sub> avant d'être évaporées sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice éclair (cyclohexane / acétate d'éthyle : 99 / 1). Le composé (*R*)-**28** (1,51 g ; 6,53 mmol) est obtenu sous forme d'un liquide translucide avec un rendement de 90 %. Le composé (*S*)-**28** (1,35 g ; 5,84 mmol) est obtenu sous forme d'un liquide translucide avec un rendement de 80 %. Les composés (*R*)-**28** et (*S*)-**28** sont stockés à – 20 °C sous atmosphère d'argon en raison de leur instabilité.

**CCM** : R<sub>f</sub> (cyclohexane / acétate d'éthyle : 98 / 2) = 0,5 (vanilline)

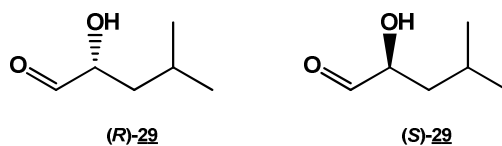
[α]<sub>D</sub><sup>21</sup> : (*R*)-**28** : + 52,4° (c = 1 ; CHCl<sub>3</sub>) ; (*S*)-**28** : – 49,3° (c = 1,1 ; CHCl<sub>3</sub>)

**RMN** <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 0,06 (3H ; s ; H<sub>8a</sub>) ; 0,09 (3H ; s ; H<sub>8b</sub>) ; 0,93 – 0,96 (15H ; m ; H<sub>5</sub> et H<sub>8</sub>) ; 1,42 (1H ; ddd ; J = 4,8 ; 8,6 et 13,6 Hz ; H<sub>3a</sub>) ; 1,52 (1H ; ddd ; J = 5,5 ; 8,4 et 13,6 Hz ; H<sub>3b</sub>) ; 1,81 (1H ; m ; H<sub>7</sub>) ; 4,02 (1H ; ddd ; J = 1,5 ; 4,8 et 8,4 Hz ; H<sub>2</sub>) ; 9,58 (1H ; d ; J = 1,5 Hz ; H<sub>1</sub>)

**RMN** <sup>13</sup>C (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : – 5,0 (C<sub>6a</sub>) ; – 4,5 (C<sub>6b</sub>) ; 18,3 (C<sub>7</sub>) ; 21,8 (C<sub>3a</sub>) ; 23,4 (C<sub>3b</sub>) ; 23,6 (C<sub>4</sub>) ; 25,7 (C<sub>8</sub>) ; 41,4 (C<sub>3</sub>) ; 76,3 (C<sub>2</sub>) ; 204,3 (C<sub>1</sub>)

**HRMS** : m/z : (M+Na+MeOH)<sup>+</sup> théorique : 285,1862 ; mesuré : 285,1855.

### Synthèse du 2-hydroxy-4-méthylpentanal (*R*)-**29** et (*S*)-**29**



Formule Brute : C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>  
Masse Moléculaire : 116,16

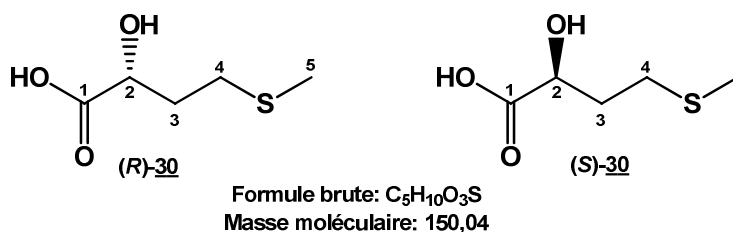
À une solution du composé (*R*)-**28** ou (*S*)-**28** (1 g ; 4,3 mmol) dans le THF anhydre (45 mL) placée à 0 °C est lentement ajouté 5,4 mL d'une solution de fluorure de tétrabutylammonium à 1M dans le THF (5,4 mmol ; 1,25 éq.). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à 0 °C pendant 2 heures. La réaction est suivie par CCM (cyclohexane / acétate d'éthyle : 7 / 3).

Une fois la réaction terminée, 30 mL d'une solution de NaCl saturée sont ajoutés dans le milieu réactionnel. Le milieu réactionnel est extrait trois fois avec 50 mL d'éther. Les phases organiques sont réunies, séchées sur MgSO<sub>4</sub>, puis évaporées sous pression réduite. Le composé (*R*)-**29** (344 mg ; 2,94 mmol) est obtenu sous la forme d'une cire blanche avec un rendement de 68 %. Le composé (*S*)-**29** (320 mg ; 2,74 mmol) est obtenu sous la forme d'une cire blanche avec un rendement de 64 %.

Compte tenue de l'instabilité des aldéhydes α-hydroxylés en général, ce produit sera utilisé directement en solution pour l'étape suivante et donc caractérisé *via* la réaction avec la TK.

**CCM** : R<sub>f</sub> (cyclohexane / acétate d'éthyle : 7 / 3) = 0,34 (vanilline)

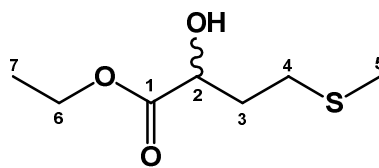
## Synthèse de l'acide 2-hydroxy-4-(methylthio)butanoïque (*R*)-**30** et (*S*)-**30**



- (*R*)-**30** : Dans un ballon de 2 L, 25 g (167,6 mmol) de D-méthionine sont dissous dans un mélange de 651,5 mL d'eau distillée et 18,5 mL d'acide sulfurique concentré. La solution obtenue est placée sous agitation dans un bain de glace (0 à – 5 °C). Une solution de nitrite de sodium (34,5 g ; 0,5 mol ; 225 mL d'eau) est lentement ajoutée (2 à 3 heures). Après l'addition de la solution de nitrite de sodium, la réaction est laissée sous agitation à température ambiante pendant 20 heures. Une fois la réaction terminée, le milieu réactionnel est saturé par ajout de NaCl avant d'être extrait avec une fois 500 mL, puis deux fois 250 mL d'éther. Les phases organiques sont réunies, lavées deux fois avec 50 mL d'une solution saturée de NaCl, séchées sur  $MgSO_4$ , puis évaporées sous pression réduite. Le résidu obtenu (composé (*R*)-**30** ; 4,45 g) sera utilisé dans l'étape suivante sans purification.

- (*S*)-**30** : Dans un ballon de 500 mL, 10 g (67 mmol) de L-méthionine sont dissous dans un mélange de 162,5 mL d'eau distillée et 4,5 mL d'acide sulfurique concentré. La solution obtenue est placée sous agitation dans un bain de glace (0 à – 5 °C). Une solution de nitrite de sodium (13,9 g ; 0,2 mol ; 125 mL d'eau) est lentement ajoutée (2 à 3 heures). Après l'addition de la solution de nitrite de sodium, la réaction est laissée sous agitation à température ambiante pendant 20 heures. Une fois la réaction terminée, le milieu réactionnel est saturé par ajout de NaCl avant d'être extrait avec une fois 200 mL, puis deux fois 100 mL d'éther. Les phases organiques sont réunies, lavées deux fois avec 30 mL d'une solution saturée de NaCl, séchées sur  $MgSO_4$ , puis évaporées sous pression réduite. Le résidu obtenu (composé (*S*)-**30** ; 2,41 g) sera utilisé dans l'étape suivante sans purification.

## Synthèse du 2-hydroxy-4-(méthylthio)butyrate d'éthyle *rac*-**31**



Formule Brute :  $C_7H_{14}O_3S$   
Masse Moléculaire : 178,25

À 4,5 g (26,6 mmol) d'acide 2-hydroxy-4-(méthylthio)butyrique (sous forme de sel de calcium) sont ajoutés 250 mL d'éthanol absolu, 250 mL de chloroforme et 18 g de résine acide Amberlyst® 15. Le milieu réactionnel est chauffé à 85 °C sous agitation pendant 24 heures. Les vapeurs étant continuellement condensées à travers du tamis moléculaire activé 4 Å avant de retourner dans le milieu réactionnel. La réaction est suivie par CCM.

Une fois la réaction achevée, le milieu réactionnel est filtré sur verre fritté (avec célite). Le filtrat obtenu est évaporé sous pression réduite. Le composé *rac*-**31** (4,67 g ; 26,2 mmol) est obtenu sous forme d'un liquide translucide avec un rendement de 98 %.

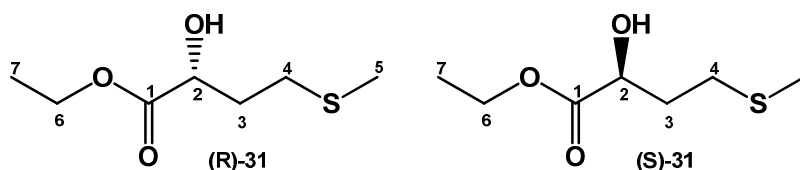
**CCM** :  $R_f$  (cyclohexane / acétate d'éthyle : 5 / 5) = 0,77 (molybdate de cérium)

**RMN  $^1H$**  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  : 1,25 (3H ; t ;  $J = 7,1$  Hz ;  $H_7$ ) ; 1,90 (1H ; td ;  $J = 7,8$  Hz et 14,1 Hz ;  $H_{3a}$ ) ; 2,05 (4H ; m ;  $H_5 + H_{3b}$ ) ; 2,59 (2H ; m ;  $H_4$ ) ; 3,4 (1H ; s ; OH) ; 4,2 (2H ; q ;  $J = 7,1$  Hz ;  $H_6$ ) ; 4,25 (1H ; dd ;  $J = 3,9$  et 7,8 Hz ;  $H_2$ )

**RMN  $^{13}C$**  (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  : 14,15 ( $C_7$ ) ; 15,40 ( $C_5$ ) ; 29,57 ( $C_3$ ) ; 33,32 ( $C_4$ ) ; 61,81 ( $C_6$ ) ; 69,17 ( $C_2$ ) ; 174,87 ( $C_1$ )

**HRMS**  $m/z$  :  $(M+Na)^+$  théorique : 201,0561 ; trouvée : 201,0574

## Synthèse du 2-hydroxy-4-(méthylthio)butyrate d'éthyle (*R*)-**31** et (*S*)-**31**



Formule Brute :  $C_7H_{14}O_3S$   
Masse Moléculaire : 178,25

- (*R*)-**31** : le composé (*R*)-**30** (4,45 g) est solubilisé dans un mélange de 200 mL de chloroforme et de 400 mL d'éthanol absolu auxquels sont ajoutés 5 g d'Amberlyst® 15. Le milieu réactionnel est chauffé à 85 °C sous agitation pendant 24 heures. Les vapeurs étant continuellement condensées à travers du tamis moléculaire activé 4 Å avant de retourner dans le milieu réactionnel. La réaction est suivie par CCM. Une fois la réaction achevée, le milieu réactionnel est filtré sur verre fritté (avec célite). Après évaporation sous pression réduite, le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice éclair (cyclohexane / acétate d'éthyle : 8 / 2). Le composé (*R*)-**31** (2,1 g ; 11,7 mmol) est obtenu sous forme d'un liquide translucide avec un rendement de 7 %.

- (*S*)-**31** : le composé (*S*)-**30** (2,41 g) est solubilisé dans un mélange de 100 mL de chloroforme et de 150 mL d'éthanol absolu auxquels sont ajoutés 2 g d'Amberlyst® 15. Le milieu réactionnel est chauffé à 85 °C sous agitation pendant 24 heures. Les vapeurs étant continuellement condensées à travers du tamis moléculaire activé 4 Å avant de retourner dans le milieu réactionnel. La réaction est suivie par CCM. Une fois la réaction achevée, le milieu réactionnel est filtré sur verre fritté (avec célite). Après évaporation sous pression réduite, le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice éclair (cyclohexane / acétate d'éthyle : 8 / 2). Le composé (*S*)-**31** (2,47 g ; 13,9 mmol) est obtenu sous forme d'un liquide translucide avec un rendement de 21 %.

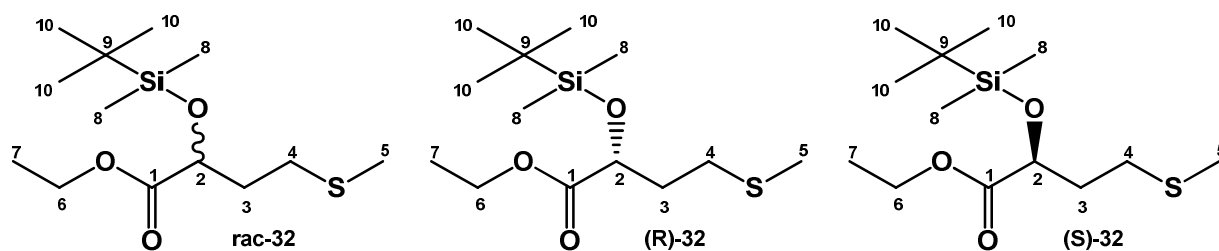
**CCM** :  $R_f$  (cyclohexane / acétate d'éthyle : 8 / 2) = 0,35 (molybdate de cérium)

$[\alpha]_D^{21}$  : (*R*)-**31** : + 6,9° ( $c = 1,2$ ;  $CHCl_3$ ) ; (*S*)-**31** : - 7,1° ( $c = 1,1$  ;  $CHCl_3$ )

**RMN  $^1H$**  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  : 1,25 (3H ; t ;  $J = 7,1$  Hz ;  $H_7$ ) ; 1,90 (1H ; td ;  $J = 7,8$  Hz et 14,1 Hz ;  $H_{3a}$ ) ; 2,05 (4H ; m ;  $H_5 + H_{3b}$ ) ; 2,59 (2H ; m ;  $H_4$ ) ; 3,4 (1H ; s ; OH) ; 4,2 (2H ; q ;  $J = 7,1$  Hz ;  $H_6$ ) ; 4,25 (1H ; dd ;  $J = 3,9$  Hz et 7,8 Hz ;  $H_2$ )

**RMN  $^{13}C$**  (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  : 14,15 ( $C_7$ ) ; 15,40 ( $C_5$ ) ; 29,57 ( $C_3$ ) ; 33,32 ( $C_4$ ) ; 61,81 ( $C_6$ ) ; 69,17 ( $C_2$ ) ; 174,87 ( $C_1$ )

### Synthèse du (2-hydroxy-4-(méthylthio)butyrate d'éthyle *rac*-**32**, (*R*)-**32** et (*S*)-**32**



Formule Brute :  $C_{13}H_{28}O_3SSi$   
Masse Moléculaire : 292,51

- *rac*-**32** : A une solution du composé *rac*-**31** (5,4 g ; 30,3 mmol) et d'imidazole (4,12 g ; 60,6 mmol ; 2 équ.) dans le  $CH_2Cl_2$  anhydre (100 mL), est ajouté une solution de chlorure de *ter*-butyl-diméthylsilyle (6,86 g ; 45,5 mmol ; 1,5 équ.) dans le  $CH_2Cl_2$  anhydre (50mL).

- (*R*)-**32** : A une solution du composé (*R*)-**31** (1,8 g ; 10,1 mmol) et d'imidazole (1,46 g ; 21,4 mmol ; 2 équ.) dans le  $CH_2Cl_2$  anhydre (35 mL), est ajouté une solution de chlorure de *ter*-butyl-diméthylsilyle (2,41 g ; 16 mmol ; 1,5 équ.) dans le  $CH_2Cl_2$  anhydre (15 mL).

- (*S*)-**32** : A une solution du composé (*S*)-**31** (2,47 g ; 13,9 mmol) et d'imidazole (1,89 g ; 27,8 mmol ; 2 équ.) dans le  $CH_2Cl_2$  anhydre (40 mL), est ajouté une solution de chlorure de *ter*-butyl-diméthylsilyle (3,14 g ; 20,9 mmol ; 1,5 équ.) dans le  $CH_2Cl_2$  anhydre (20 mL).

Après l'addition, le milieu réactionnel est laissé une nuit sous agitation à reflux du  $CH_2Cl_2$ . La réaction est suivie par CCM. Une fois la réaction achevée, le milieu réactionnel est lavé trois fois avec une solution saturée de NaCl. La phase organique est séchée sur  $MgSO_4$ , puis évaporée sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice éclair (cyclohexane / acétate d'éthyle : 95 / 5). Les composé *rac*-**32** (7,98 g ; 27,3 mmol), (*R*)-**32** (2,16 g ; 7,37 mmol) et (*S*)-**32** (3,24 g ; 11,1 mmol) sont obtenus avec des rendements respectifs de 90, 73 et 82 % sous la forme d'un liquide incolore.

**CCM** :  $R_f$  (cyclohexane / acétate d'éthyle : 8 / 2) = 0,83 (molybdate de cérium)

$[\alpha]_D^{21}$ : (*R*)-**32** : + 40,7° (c = 1,3 ;  $CHCl_3$ ) ; (*S*)-**32** : - 40° (c = 1,6 ;  $CHCl_3$ )

**RMN  $^1H$**  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  : 0,06 (3H ; s ;  $H_{8a}$ ) ; 0,08 (3H ; s ;  $H_{8b}$ ) ; 0,89 (9H ; 1s ;  $H_{10}$ ) ; 1,27 (3H ; t ; J = 7,4 ;  $H_7$ ) ; 1,98 (2H ; m ;  $H_4$ ) ; 2,09 ( 3H ; s ;  $H_5$ ) ; 2,58 (2H ; t ; J = 7,4 Hz ;  $H_3$ ) ; 4,18 (2H ; m ; J = 7,1 Hz ;  $H_6$ ) ; 4,32 (1H ; dd ; J = 5,3 et 6,8 Hz ;  $H_2$ )

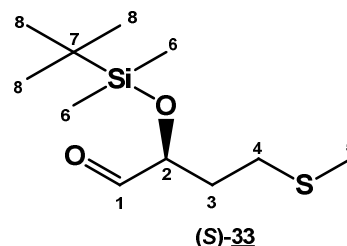
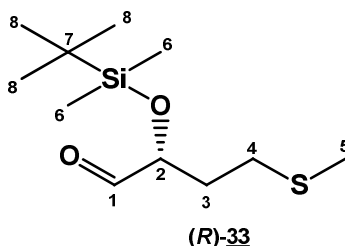
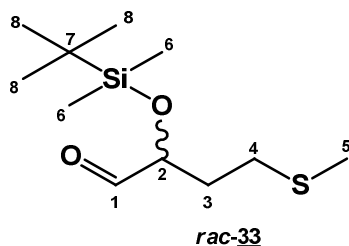
**RMN  $^{13}C$**  (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  : -5 ( $C_{8a}$ ) ; - 4,6 ( $C_{8b}$ ) ; 14,19 ( $C_7$ ) ; 15,24 ( $C_5$ ) ; 18,25 ( $C_9$ ) ; 25,70 ( $C_{10}$ ) ; 29,70 ( $C_3$ ) ; 34,33 ( $C_4$ ) ; 60,82 ( $C_6$ ) ; 70,67 ( $C_2$ ) ; 173,48 ( $C_1$ )

**HRMS** m/z : ( $M+Na$ )<sup>+</sup> théorique : 315,1426 ; trouvée : 315,1436 (déterminée sur le produit *rac*-**32**)



## Synthèse du 2-O-*ter*butyldiméthylsilyl-4-(méthylthio)butyraldéhyde

### *rac*-**33**, (*R*)-**33** et (*S*)-**33**



Formule Brute : C<sub>11</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub>SSi  
Masse Moléculaire : 248,46

- *rac*-**33** : À une solution du composé *rac*-**32** (8 g ; 27,3 mmol) dans le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhydre (200mL) placée à – 78 °C, sont lentement ajoutés 41 mL d’une solution d’hydru de diisobutylaluminium à 1M dans le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (41 mmol ; 1,5 éq.).

- (*R*)-**33** et (*S*)-**33** : À une solution du composé (*R*)-**32** et (*S*)-**32** (2 g ; 6,83 mmol) dans le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhydre (50 mL) placée à – 78 °C sont lentement ajoutés 8,9 mL d’une solution d’hydru de diisobutylaluminium à 1M dans le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8,9 mmol ; 1,3 éq.).

La réaction est laissée à – 78 °C sous agitation pendant une nuit. La réaction est suivie par CCM. Une fois la réaction terminée, 20 mL (5 mL) de méthanol sont ajoutés au milieu réactionnel. Après retour à température ambiante, 200 mL (50 mL) d’une solution saturée de NH<sub>4</sub>Cl sont ajoutés et le milieu réactionnel est laissé sous vive agitation durant 30 minutes. L’extraction est réalisée avec trois fois 100 mL (25 mL) d’acétate d’éthyle. Les phases organiques sont séchées sur MgSO<sub>4</sub> avant d’être évaporées sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice éclair (cyclohexane / acétate d’éthyle : 98 / 2). Les composés *rac*-**33** (5,3 g ; 21,3 mmol), (*R*)-**33** (1,39 g ; 5,58 mmol) et (*S*)-**33** (1,35 g ; 5,43 mmol) sont obtenus avec des rendements respectifs de 78, 82 et 80 %

**CCM** : R<sub>f</sub> (cyclohexane / acétate d’éthyle : 98 / 2) = 0,78 (molybdate de cérium)

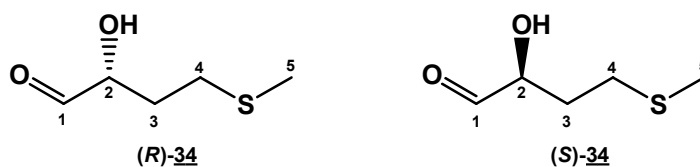
[α]<sub>D</sub><sup>21</sup> : (*R*)-**32** : + 28,8° (c = 1,3; CHCl<sub>3</sub>) ; (*S*)-**32** : – 28,2° (c = 1,6 ; CHCl<sub>3</sub>)

**RMN** <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 0,08 (3H ; s ; H<sub>6</sub>) ; 0,09 (3H ; s ; H<sub>6</sub>) ; 0,92 (9H ; s ; H<sub>8</sub>) ; 1,94 (2H ; ddd ; J = 1,2 ; 6,8 et 13,2 Hz ; H<sub>3</sub>) ; 2,03 (3H ; s ; H<sub>5</sub>) ; 2,49 (2H ; m ; J = 6,8 et 14,0 Hz ; H<sub>4</sub>) ; 4,05 (1H ; td ; J = 6,0 Hz ; H<sub>2</sub>) ; 9,59 (1H ; d ; J = 0,8 Hz, H<sub>1</sub>)

**RMN** <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : -4,96 / -4,64 (2 C<sub>8</sub>) ; 14,94 (C<sub>5</sub>) ; 18,12 (C<sub>9</sub>) ; 25,72 (3 C<sub>10</sub>) ; 29,04 (C<sub>4</sub>) ; 32,21 (C<sub>3</sub>) ; 75,81 (C<sub>2</sub>) ; 203,33 (C<sub>1</sub>)

**HRMS** m/z : (M+Na)<sup>+</sup> calculée : 249,1345 ; mesurée : 249,1354 (déterminée sur le produit *rac*-**33**)

### Synthèse du (*R*)-2-hydroxy-4-(méthylthio)butanal (*R*)-34 et (*S*)-34



Formule Brute : C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>S

Masse Moléculaire : 134,20

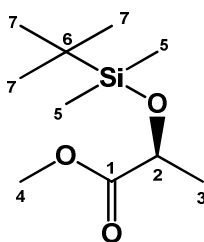
À 250 mg de composé (*R*)-33 ou (*S*)-33 (1 mmol), sont ajoutés 5 mL d'eau distillée et 500 mg de résine Dowex H<sup>+</sup>. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à 30 °C pendant une nuit. La réaction est suivie par CCM (cyclohexane / acétate d'éthyle : 5/5).

Une fois la réaction terminée, la résine est éliminée par filtration sur verre fritté et rincé 3 fois avec 1 mL d'eau distillée. On ajuste le volume final à 10 mL afin d'obtenir une solution à 100 mM (théorique) et le pH de la solution est ajusté à 7 par ajout de soude 1N.

Compte tenue de l'instabilité des aldéhydes α-hydroxylés en général, ce produit sera utilisé directement en solution pour l'étape suivante et donc caractérisé *via* la réaction avec la TK.

**CCM** : R<sub>f</sub> (cyclohexane / acétate d'éthyle : 5/5) = 0,41 (vanilline)

### Synthèse du (R)-2-((tert-butyldiméthylsilyl)oxy)propanoate d'éthyle **35**



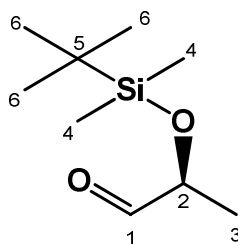
Formule brute:  $C_{10}H_{22}O_3Si$   
Masse moléculaire: 218,13

Dans un ballon monocol, 15,56 g de méthyl lactate commercial (15 mmol) sont dissous dans 40 mL de dichlorométhane anhydre. 2 g (30 mmol, 2 éq.) d'imidazole sont alors ajoutés. Dans un autre ballon sont dissous 3,4 g de chlorure de terbutyldiméthylsilyl (22,5 mmol, 1,5 éq.) dans 20 mL de dichlorométhane anhydre. Cette dernière solution est ensuite ajoutée goutte à goutte à la première solution à température ambiante et sous agitation. Le mélange résultant est alors chauffé à reflux la nuit. Le mélange est alors filtré puis la phase dichlorométhane est lavée 4 fois avec une solution saturée de chlorure de sodium. La solution est séchée sur  $MgSO_4$  puis filtrée et évaporée sous vide. Le produit obtenu est alors purifié par chromatographie éclair (cyclohexane / acétate d'éthyle : 1 / 1). 29,8 g de composé **35** sont obtenus (rendement : 95 %).

**RMN  $^1H$**  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  : 0,06 (3H ; s ;  $H_5$ ) 0,08 (3H ; s ;  $H_5$ ) ; 0,89 (9H ; 1s ;  $H_7$ ) ; 1,31 (1H ; d ;  $J = 6,8$  Hz ;  $H_3$ ) ; 3,63 (3H ; s ;  $H_4$ ) ; 4,28 (1H ; q ;  $J = 6,8$  Hz ;  $H_2$ )

Le spectre de RMN  $^1H$  est en accord avec celui de la littérature.

### Synthèse du (*R*)-2-((*tert*-butyldiméthylsilyl)oxy)propanal 36



**Formule Brute : C<sub>9</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub>Si**  
**Masse Moléculaire : 188,34**

Dans un ballon monocol de 500 mL sous atmosphère d'argon sont introduit du (*R*)-2-((*tert*-butyldiméthylsilyloxy)propanoate de méthyle (5,46 g ; 0,025 mol) et du dichlorométhane anhydre (250 mL) puis le ballon est refroidit à  $-70^{\circ}\text{C}$ . Ensuite une solution de DIBAL 1M (32,7 mL ; 0,0327 mol ; 1,3 éq.) est additionnée goutte à goutte à l'aide d'une seringue. L'avancement de la réaction est suivi par CCM en utilisant un mélange pentane / éther 99 / 1 comme éluant et une solution de KMnO<sub>4</sub> comme révélateur. La réaction est terminée après 2 heures d'agitation à  $-70^{\circ}\text{C}$ .

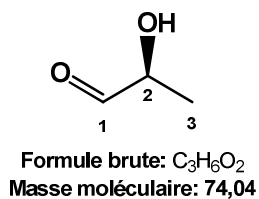
Une solution de NH<sub>4</sub>Cl saturé (5 mL) est ajoutée lentement à l'aide d'une seringue et le mélange est agité en laissant remonter la température à l'ambiante. Un précipité de couleur blanche est formé. Le mélange est filtré, puis le solide est rincé à l'eau et au CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Après extraction, la phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub>. Après évaporation sous pression contrôlée de 300 torr (le produit final est volatile), le produit est purifié par chromatographie sur gel de silice flash (pentane / éther : 99 / 1). Le produit obtenu est une huile visqueuse légèrement jaunâtre (m= 1,87 g ; rendement : 40 %).

**CCM** : R<sub>f</sub> (pentane / éther : 99 / 1) = 0,3 (KMnO<sub>4</sub>).

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 9,61 (d ; J = 1,3 Hz ; 1H ; H<sub>1</sub>) ; 4,09 (dq ; J = 1,3 ; 6,9 Hz ; 1H ; H<sub>2</sub>) ; 1,26 (d ; J = 6,9 Hz ; 3H ; H<sub>3</sub>) ; 0,92 (s ; 9H ; 3H<sub>6a</sub>+3H<sub>6b</sub>+3H<sub>6c</sub>) ; 0,1 (s ; 3H ; H<sub>4a</sub>) ; 0,09 (s ; 3H ; H<sub>4b</sub>).

Le spectre de RMN <sup>1</sup>H est en accord avec celui de la littérature.

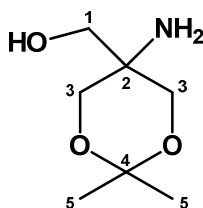
### Synthèse du (R)-2-hydroxypropanal 37



À 600 mg du composé 36 (3,1 mmol) sont ajoutés 18,6 mL d'eau distillée et 3,1 g de Dowex H<sup>+</sup>. La réaction est suivie par CCM (pentane / éther : 99 / 1 ; KMnO<sub>4</sub>). Après 12 heures de réaction à 30 °C, la résine est éliminée par filtration sur verre fritté et rincée avec un minimum d'eau. Le volume du filtrat est amené à 62 mL par ajout d'eau distillée et le pH est ajusté à 7,6 par ajout de soude 3N.

Compte tenue de l'instabilité des aldéhydes α-hydroxylés en général, ce produit sera utilisé directement en solution pour l'étape suivante et donc caractérisé *via* la réaction avec la FSA.

### Synthèse du (5-amino-2,2-diméthyl-1,3-dioxan-5-yl)méthanol 38



Formule Brute :  $C_7H_{15}NO_3$   
Masse Moléculaire: 161,20

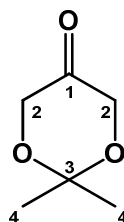
Le chlorhydrate du 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol (25,0 g ; 159,0 mmol ; 1,0 éq), le 2,2-diméthoxypropane (23,4 mL ; 19,9 g ; 191,0 mmol ; 1,2 éq) et l'acide paratoluènesulfonique monohydraté (1,5 g ; 8,0 mmol ; 0,05 éq) sont introduits dans 90 mL de DMF fraîchement distillé. Le mélange est laissé sous agitation pendant 40 heures à température ambiante sous atmosphère d'argon. La triéthylamine (1,4 mL ; 1 g ; 9,6 mmol ; 0,06 éq) est ajouté puis le milieu est laissé sous agitation pendant 10 min à température ambiante. Le DMF est enlevé par distillation (65 °C / 36 torr). Au brut réactionnel (obtenu sous forme d'une gomme jaune) sont ajoutés 100 mL d'acétate d'éthyle contenant 22 mL de triéthylamine (15,9 g ; 156,5 mmol, 1,0 éq). Le mélange est trituré jusqu'à l'obtention d'un précipité blanc (chlorhydrate de triéthylamine). Après ajout de 200 mL d'acétate d'éthyle, le mélange est laissé sous agitation pendant 10 minutes. Le précipité est filtré sur verre fritté et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le composé 38 (m = 31 g) est obtenu sans purification sous la forme une huile visqueuse jaunâtre.

**CCM** : Rf (dichlorométhane / méthanol : 8 / 2) = 0,5 (ninhydrine)

**RMN  $^1H$**  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  : 1,40 (3H ; s ;  $H_{5a}$ ) ; 1,43 (3H ; s ;  $H_{5b}$ ) ; 2,84 (3H ; se ; OH- $NH_2$ ) ; 3,50 (2H ; s ;  $H_1$ ) ; 3,55 (2H ; d ; J = 11,6 Hz ;  $H_{3a}$ ) ; 3,77 (2H ; d ; J = 11,6 Hz ;  $H_{3b}$ )

**RMN  $^{13}C$**  (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  : 22,2 ( $C_{5a}$ ) ; 24,8 ( $C_{5b}$ ) ; 50,2 ( $C_2$ ) ; 64,5 ( $C_1$ ) ; 67,1 ( $C_3$ ) ; 98,4 ( $C_4$ )

### Synthèse du 2,2-diméthyl-1,3-dioxan-5-one 39



Formule Brute :  $C_6H_{10}O_3$   
Masse Moléculaire : 130,14

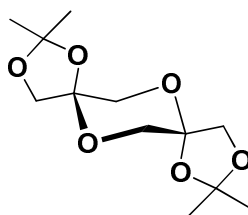
À 15,5 g de composé 38 sont ajoutés 110 mL d'eau distillée et 17,2 g de  $KH_2PO_4$  (126,25 mmol ; 1,6 éq). Une solution aqueuse de  $NaIO_4$  (380 mL ; 0,5 M ; 2,4 éq) est additionnée au goutte à goutte, à l'aide d'une ampoule de coulée, en maintenant la température du milieu réactionnel entre 5 et 10 °C. L'addition se fait sur une durée de 1 h, un précipité blanc se forme pendant l'addition. Le mélange est agité pendant 1,5 h à une température de 5 °C. Le précipité est filtré sur verre fritté et le composé 39 est extrait de la solution aqueuse avec du  $CH_2Cl_2$  (17 × 60 mL). Les phases organiques sont regroupées puis séchées sur  $MgSO_4$ . Après évaporation du solvant, le produit est purifié par chromatographie sur gel de silice flash (pentane / éther : 7 / 3). Le produit obtenu est un liquide incolore (m = 6,56 g ; rendement : 60 %).

**CCM** :  $R_f$  (cyclohexane / acétate d'éthyle : 7 / 3) = 0,6 (vanilline)

**RMN  $^1H$**  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  1,45 (6H ; s ;  $H_4$ ) ; 4,15 (4H ; s ;  $H_2$ )

**RMN  $^{13}C$**  (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  : 23,4 ( $C_4$ ) ; 66,7 ( $C_2$ ) ; 100,0 ( $C_3$ ) ; 207,9 ( $C_1$ )

**Obtention du 2,2,10,10-tetraméthyl-1,3,6,9,11,13-hexaoxadispiro[4.2.4.2]tétradécane 40**



**Formule brute: C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>**  
**Masse moléculaire: 260,13**

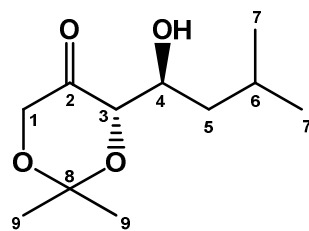
Ce produit a été obtenu en tant que sous produit lors de la synthèse du composé 39.

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ : 1,44 (6H ; s) ; 1,50 (6H ; s) ; 3,62 (2H ; d ; J = 11,7 Hz) ; 3,73 (2H ; d ; J = 9,3 Hz) ; 4,03 (2H ; d ; J = 9,2 Hz) ; 4,16 (2H ; d ; J = 11,5 Hz)

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ : 26,3 ; 26,7 ; 65,4 ; 75,0 ; 100,4 ; 112,1.



## Synthèse du (S)-4-((S)-1-hydroxy-3-methylbutyl)-2,2-diméthyl-1,3-dioxan-5-one **41**



Formule Brute :  $C_{11}H_{20}O_4$   
Masse Moléculaire : 216,27

À une solution de composé **39** (3 g ; 20,3 mmol ; 1,75 éq) dans le DMF anhydre (10 mL) sont ajoutés 1 g d'isovaléraldéhyde (11,6 mmol ; 1 éq) et 400 mg de L-proline (3,5 mmol ; 0,3 éq). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 90 heures à 4 °C (la réaction est effectuée en chambre froide).

Une fois la réaction terminée, le milieu réactionnel est lavé avec une solution de  $NH_4Cl$  demi-saturée (10 mL) et de l'acétate d'éthyle (10 mL). La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle ( $3 \times 15$  mL). Les phases organiques sont réunies, lavées avec une solution aqueuse de NaCl saturée et séchées sur  $MgSO_4$ . Après évaporation des solvant sous pression réduite, le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice flash (cyclohexane / acétate d'éthyle : 9 / 1).

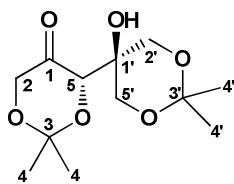
Le composé **41** (1,2 g ; 5,55 mmol) est obtenu sous la forme d'une huile visqueuse légèrement jaunâtre avec un rendement de 50 %.

**CCM** :  $R_f$  (cyclohexane / acétate d'éthyle : 7 / 3) = 0,5 (vanilline)

**RMN  $^1H$**  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  : 0,91 (3H ; d ;  $J=6,4$  Hz ;  $H_{7a}$ ) ; 0,94 (3H ; d ;  $J=6,8$  Hz ;  $H_{7b}$ ) ; 1,33-1,51 (2H ; m ;  $H_{5a}-H_{5b}$ ) ; 1,44 (3H ; s ;  $H_{9a}$ ) ; 1,47 (3H ; s ;  $H_{9b}$ ) ; 1,87 (1H ; m ;  $H_6$ ) ; 3,96 (1H ; m ;  $H_4$ ) ; 4,02 (1H ; d ;  $J = 17,6$  Hz ;  $H_{1a}$ ) ; 3,99 (1H ; dd ;  $J = 1,6 ; 6,5$  Hz ;  $H_3$ ) ; 4,17 (1H ; dd ;  $J = 1,6 ; 17,6$  Hz ;  $H_{1b}$ )

**RMN  $^{13}C$**  (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  : 21,4 ( $C_{7a}$ ) ; 23,4 ( $C_{9a}$ ) ; 23,7 ( $C_{9b}$ ) ; 23,8 ( $C_{7b}$ ) ; 24,0 ( $C_6$ ) ; 41,1 ( $C_5$ ) ; 66,7 ( $C_1$ ) ; 68,8 ( $C_4$ ) ; 76,5 ( $C_3$ ) ; 100,9 ( $C_8$ ) ; 210,9 ( $C_2$ )

**Obtention du 5'-Hydroxy-2,2,2',2'-tetraméthyl-[4,5']bi[[1,3]dioxanyl]-5-one 42**



**Formule Brute : C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>**

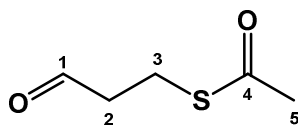
**Masse Moléculaire : 260,28**

Ce produit a été obtenu en tant que sous produit lors de la synthèse du composé 41.

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ : 1,40 ; 1,44 ; 1,46 ; 1,47 (12H ; 4s ; H<sub>4</sub> ; H<sub>4'</sub>) ; 2,85 (1H ; se ; OH) ; 3,64 (1H ; dd ; J = 11,7 ; 0,8 Hz ; H<sub>5'a</sub>) ; 3,83 (1H ; dd ; J = 12,1 ; 0,8 Hz ; H<sub>2'a</sub>) ; 3,99 (1H ; d ; J = 17,2 Hz ; H<sub>2a</sub>) ; 4,02 (1H ; dd ; J = 11,7 ; 1,2 Hz ; H<sub>5'b</sub>) ; 4,11 (1H ; dd ; J = 12,1 ; 1,2 Hz ; H<sub>2'b</sub>) ; 4,25 (1H ; dd ; J = 17,2 ; 1,4 Hz ; H<sub>2b</sub>) ; 4,46 (1H ; d ; J = 1,3 Hz ; H<sub>5</sub>)

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ : 23,3 ; 23,4 ; 23,7 ; 24,0 (2 C<sub>4</sub> et 2 C<sub>4'</sub>) ; 64,6 ; 65,3 (C<sub>2'</sub> et C<sub>5'</sub>) ; 67,4 (C<sub>2'</sub>) ; 68,8 (C<sub>1'</sub>) ; 74,0 (C<sub>5</sub>) ; 98,5 ; 101,2 (C<sub>3</sub> et C<sub>3'</sub>) ; 207,5 (C<sub>1</sub>).

### Synthèse de l'éthanethioate de 3-oxopropyle **43**



Formule Brute :  $C_5H_8O_2S$

Masse Moléculaire: 132,18

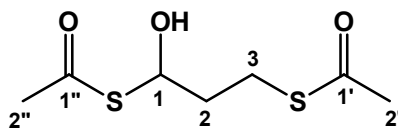
Sous atmosphère d'argon, 7,5 mL d'acide thioacétique (105 mmol ; 1,4 éq.) sont très lentement additionnés à 5 mL d'acroléine (75 mmol ; 1 éq.) placée à  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Le mélange est laissé sous agitation pour la nuit en laissant remonter la température à l'ambiante. Après une purification par distillation sous pression réduite ( $92\text{ }^{\circ}\text{C}$  / 14 torr), le composé **43** (6 g ; 45,4 mmol) est obtenu sous la forme d'une huile incolore avec un rendement de 60 %.

**CCM** :  $R_f$  (cyclohexane / acétate d'éthyle : 7 / 3) = 0,55 (vanilline + UV)

**RMN  $^1\text{H}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 2,31 (3H ; s ;  $\text{H}_5$ ) ; 2,78 (2H ; td ;  $J = 0,9$  et  $6,8\text{ Hz}$  ;  $\text{H}_2$ ) ; 3,09 (2H ; t ;  $J = 6,8\text{ Hz}$  ;  $\text{H}_3$ ) ; 9,73 (1H ; t ;  $J = 0,9\text{ Hz}$  ;  $\text{H}_1$ )

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 21,6 ( $\text{C}_2$ ) ; 29,7 ( $\text{C}_5$ ) ; 43,8 ( $\text{C}_3$ ) ; 195,6 ( $\text{C}_4$ ) ; 199,9 ( $\text{C}_1$ )

**Obtention du *S*-(3-acetylsulfanyl-1-hydroxy-propyl) ester de l'acide thioacétique 44**



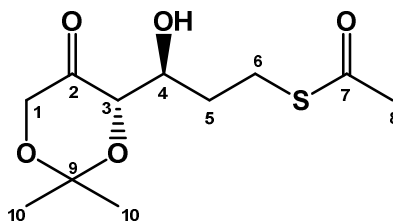
Formule Brute : C<sub>7</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>S<sub>2</sub>  
Masse Moléculaire : 208,02

Ce produit a été obtenu en tant que sous produit lors de la synthèse du composé 43.

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ(ppm) : 1,94 (1H ; m ; H<sub>2a</sub>) ; 2,05 (1H ; m ; H<sub>2b</sub>) ; 2,29 (6H ; s ; H<sub>2'</sub>, H<sub>2''</sub>) ; 2,95 (2H ; m ; H<sub>3</sub>) ; 5,56 (1H ; dd ; J = 8 ; 4,4 Hz ; H<sub>1</sub>)

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ(ppm) : 25,4 (C<sub>2</sub>) ; 30,5 (C<sub>2'</sub>) ; 30,6 (C<sub>2''</sub>) ; 34,3 (C<sub>3</sub>) ; 77,1 (C<sub>1</sub>) ; 194,5 (C<sub>1'</sub>) ; 198,3 (C<sub>1''</sub>).

**Synthèse de l'éthanethioate de  
(S)-3-((S)-2,2-diméthyl-5-oxo-1,3-dioxan-4-yl)-3-hydroxypropyle 45**



**Formule Brute : C<sub>11</sub>H<sub>18</sub>O<sub>5</sub>S**  
**Masse Moléculaire : 262,32**

À une solution de composé **39** (4,50 g ; 35 mmol ; 1,2 éq.) dans le DMF anhydre (28 mL) sont ajoutés 3,85 g de composé **43** (30 mmol ; 1 éq.) et 1 g de L-proline (9 mmol ; 0,3 éq.). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 90 heures à 4 °C (la réaction est effectuée en chambre froide).

Une fois la réaction terminée, le milieu réactionnel est lavé avec une solution de NH<sub>4</sub>Cl demi-saturée (10 mL) et de l'acétate d'éthyle (10 mL). La phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (3 × 15 mL). Les phases organiques sont réunies, lavées avec une solution aqueuse de NaCl saturée et séchées sur MgSO<sub>4</sub>. Après évaporation des solvants sous pression réduite, le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice flash (cyclohexane / acétate d'éthyle : 9 / 1).

Le composé **45** (1,97 g ; 7,5 mmol) est obtenu sous la forme d'une huile visqueuse légèrement jaunâtre avec un rendement de 25 %.

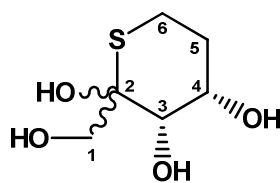
**CCM** : R<sub>f</sub> (cyclohexane / acétate d'éthyle : 7 / 3) = 0,4 (vanilline + UV)

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 1,41 (3H ; s ; H<sub>10a</sub>) ; 1,45 (3H ; s ; H<sub>10b</sub>) ; 1,83 (4H ; m ; H<sub>5</sub>) ; 2,32 (3H ; s ; H<sub>8</sub>) ; 2,97-3,09 (2H ; m ; H<sub>6</sub>) ; 3,92 (1H ; m ; H<sub>4</sub>) ; 4,00 (1H ; d ; J = 17,4 Hz ; H<sub>1a</sub>) ; (1H ; dd ; J = 1,2 ; 6,4 Hz ; H<sub>3</sub>) ; 4,23 (1H ; dd ; J = 1,2 ; 17,4 Hz ; H<sub>1b</sub>)

**RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 23,6 (C<sub>10a</sub>) ; 23,8 (C<sub>10b</sub>) ; 25,0 (C<sub>6</sub>) ; 30,7 (C<sub>8</sub>) ; 32,3 (C<sub>5</sub>) ; 66,7 (C<sub>1</sub>) ; 69,2 (C<sub>4</sub>) ; 75,9 (C<sub>3</sub>) ; 101,1 (C<sub>9</sub>) ; 196,3 (C<sub>7</sub>) ; 210,7 (C<sub>2</sub>)

**HRMS** m/z : (M+Na)<sup>+</sup> calculée : 285,0773 ; mesurée : 285,0771

## Synthèse du 2-(hydroxyméthyl)tetrahydro-2H-thiopyran-2,3,4-triol 47



Formule brute:  $C_6H_{12}O_4S$   
Masse moléculaire: 180,05

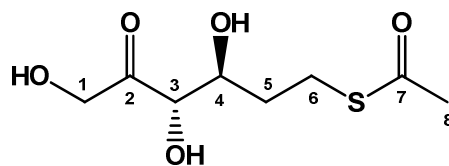
Ce produit a été obtenu en tant que sous produit (sous la forme de deux anomères numérotés n pour l'un et n' pour l'autre) lors de la synthèse du composé 7, après passage en milieu acide (Dowex  $H^+$ ) de l'intermédiaire non caractérisé 46.

**RMN  $^1H$**  ( $CD_3OD$ , 400 MHz)  $\delta$  : 1,82 – 2,00 (3H ; m ;  $H_{5'a} + H_{5a} + H_{6'a}$ ) ; 2,14 – 2,20 (1H ; m ;  $H_{5b}$ ) ; 2,37 (1H ; td ;  $J = 14$  et  $4,4$  Hz ;  $H_{6a}$ ) ; 2,45 (1H ; td ;  $J = 4$  et  $13,2$  Hz ;  $H_{6a'}$ ) ; 2,88 (1H ; m ;  $H_{5'b}$ ) ; 3,07 (1H ; m ;  $H_{6b}$ ) ; 3,53 (1H ; d ;  $J = 11,6$  Hz ;  $H_{1a}$ ) ; 3,57 (1H ; d ;  $J = 11,6$  Hz ;  $H_{1'a}$ ) ; 3,66 (1H ; d ;  $J = 11,2$  Hz ;  $H_{1'b}$ ) ; 3,73 (1H ; d ;  $J = 2,8$  Hz ;  $H_{3'}$ ) ; 3,77 (1H ; d ;  $J = 11,6$  Hz ;  $H_{1b}$ ) ; 3,86 (2H ; m ;  $H_3 + H_{4'}$ ) ; 4,02 (1H ; m ;  $H_4$ )

**RMN  $^{13}C$**  ( $CD_3OD$ , 100 MHz)  $\delta$  : 21,0 ; 24,3 ; 30,4 ; 35,4 ; 67,3 ; 68,3 ; 69,0 ; 86,5 ; 87,2

**HRMS** m/z :  $(M+Na)^+$  calculée : 203,0354 ; mesurée : 203,0367

### Synthèse de l'éthanethioate de (3S,4S)-3,4,6-trihydroxy-5-oxohexyle 48



Formule Brute :  $C_8H_{14}O_5S$   
Masse Moléculaire : 222,26

À une suspension du composé 45 (800 mg ; 3,05 mmol) dans l'eau distillé (30 mL) sont ajoutés 800 mg de Dowex  $H^+$ . Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante. La réaction est suivi par CCM (cyclohexane / acétate d'éthyle : 7 / 3).

Une fois la réaction terminée, la résine est éliminée par filtration sur verre fritté et le filtrat obtenu est évaporé sous pression réduite. Après évaporation de l'eau, le composé 48 (650 mg ; 2,92 mmol) est obtenu sans purification sous la forme d'une huile incolore avec un rendement de 96 %.

**CCM** :  $R_f$  (dichlorométhane / méthanol : 9 / 1) = 0,45 (vanilline + UV)

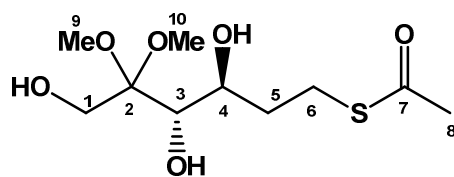
$[\alpha]_D^{21} = -35,9^\circ$  ( $c = 1,7$  ; MeOH)

**RMN  $^1H$**  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  : 1,75 (2H ; m ;  $H_5$ ) ; 2,31 (3H ; s ;  $H_8$ ) ; 2,90 (1H ; m ;  $H_{6a}$ ) ; 3,07 (1H ; m ;  $H_{6b}$ ) ; 3,79 (1H ; m ;  $H_4$ ) ; 4,07 (1H ; d ;  $J = 5,6$  Hz ;  $H_3$ ) ; 4,40 (1H ; d ;  $J = 19,2$  Hz ;  $H_{1a}$ ) ; 4,50 (1H ; d ;  $J = 19,2$  Hz ;  $H_{1b}$ )

**RMN  $^{13}C$**  (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  : 26,5 ( $C_5$ ) ; 30,5 ( $C_8$ ) ; 33,6 ( $C_6$ ) ; 68,1 ( $C_1$ ) ; 72,8 ( $C_4$ ) ; 79,5 ( $C_3$ ) ; 197,6 ( $C_7$ ) ; 212,9 ( $C_2$ ).

**HRMS**  $m/z$  :  $(M+Na)^+$  calculée : 467,1022 ; mesurée : 467,1016

## Synthèse de l'éthanethioate de (3*S*,4*S*)-3,4,6-trihydroxy-5,5-dimethoxyhexyle **49**



Formule Brute : C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>S  
Masse Moléculaire : 268,33

Le produit **48** (780 mg ; 3,51 mmol ; 1 éq) est dissout dans l'orthoformiate de méthyle (7,8 mL ; 7,57 g ; 71,30 mmol ; 20,3 éq) puis de l'acide paratoluènesulfonique monohydraté (67 mg ; 0,35 mmol ; 0,1 éq) est ajouté. La réaction est agitée pendant 3 heures sous atmosphère d'argon. Ensuite de la triéthylamine (50,2  $\mu$ L ; 37 mg ; 0,36 mmol ; 0,101 éq) est ajouté. L'orthoformiate de méthyle est évaporé puis le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice flash (cyclohexane / AcOEt : 8 / 2). Le produit **49** est obtenu sous la forme d'une huile incolore (570 mg) avec un rendement de 60 %.

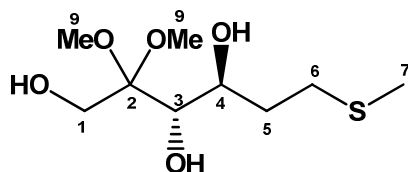
**CCM** : R<sub>f</sub> (cyclohexane / acétate d'éthyle : 7/3) = 0,6 (vanilline + UV)

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  : 2,01 (1H ; m ; H<sub>5a</sub>) ; 2,20 (1H ; m ; H<sub>5b</sub>) ; 2,32 (3H ; s ; H<sub>8</sub>) ; 2,95 (1H ; m ; H<sub>6a</sub>) ; 3,07 (1H ; m ; H<sub>6b</sub>) ; 3,19 (3H ; s ; H<sub>9</sub>) ; 3,32 (3H ; s ; H<sub>10</sub>) ; 3,80 (1H ; d ; J = 11,6 Hz ; H<sub>1a</sub>) ; 3,85 (1H ; d ; J = 10,4 Hz ; H<sub>1b</sub>) ; 4,15 (1H ; m ; H<sub>4</sub>) ; 4,30 (1H ; d ; J = 2,7 Hz ; H<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  : 26,5 (C<sub>6</sub>) ; 27,5 (C<sub>5</sub>) ; 30,6 (C<sub>8</sub>) ; 50,0 (C<sub>9</sub>) ; 50,8 (C<sub>10</sub>) ; 64,3 (C<sub>1</sub>) ; 72,2 (C<sub>3</sub>) ; 77,7 (C<sub>4</sub>) ; 93,5 (C<sub>2</sub>) ; 195,6 (C<sub>7</sub>).



## Synthèse de (3*S*,4*S*)-2,2-diméthoxy-6-(méthylthio)hexane-1,3,4-triol 50



Formule Brute :  $C_9H_{20}O_5S$   
Masse Moléculaire : 240,32

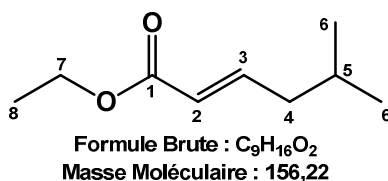
Le produit 49 (418 mg ; 1,56 mmol ; 1 éq) est dissout dans EtOH (22 mL), ensuite est ajouté NaOH (2M ; 7,52 mL). Le milieu réactionnel est agité pendant 5 minutes et l'iodure de méthyle (195  $\mu$ L ; 442 mg ; 3,12 mmol ; 2 éq.) est additionné au goutte à goutte. La réaction est agitée pendant une nuit. Ensuite une solution aqueuse de NaCl saturée (10 mL) et  $Na_2S_2O_5(s)$  (148 mg ; 0,78 mmol ; 0,5 éq.) sont ajoutés puis le milieu est extrait à l'AcOEt ( $3 \times 25$  mL). Les phases organiques sont réunies, séchées sur  $MgSO_4$  puis le solvant est évaporé. Le produit 50 (800 mg) est utilisé tel quel pour l'étape suivante.

CCM :  $R_f$  (cyclohexane / acétate d'éthyle : 7 / 3) = 0,6 (vanilline)

**RMN  $^1H$**  ( $CD_3OD$ , 400 MHz)  $\delta$  : 2,04 (1H ; m ;  $H_{5a}$ ) ; 2,06 (3H ; s ;  $H_7$ ) ; 2,16 (1H ; m ;  $H_{5b}$ ) ; 2,57 (1H ; m ;  $H_{6a}$ ) ; 2,63 (1H ; m ;  $H_{6b}$ ) ; 3,18 (3H ; s ;  $H_8$ ) ; 3,31 (3H ; s ;  $H_9$ ) ; 3,74 (1H ; d ;  $J = 11,6$  Hz ;  $H_{1a}$ ) ; 3,85 (1H ; d ;  $J = 11,2$  Hz ;  $H_{1b}$ ) ; 4,20 (1H ; m ;  $H_4$ ) ; 4,30 (1H ; d ;  $J = 4$  Hz ;  $H_3$ ).

**RMN  $^{13}C$**  ( $CD_3OD$ , 100 MHz)  $\delta$  : 15,4 ( $C_7$ ) ; 28,3 ( $C_6$ ) ; 32,2 ( $C_5$ ) ; 48,4 ( $C_8 + C_9$ ) ; 65,5 ( $C_1$ ) ; 74,5 ( $C_3$ ) ; 79,2 ( $C_4$ ) ; 95,0 ( $C_2$ ) ; 93,5 ( $C_5$ ).

## Synthèse du (E)-5-methylhex-2-enoate d'éthyle 51



À une solution de triéthyl phosphonoacétate (8 g ; 30,8 mmol) dans le THF anhydre (400 mL) placée à 0 °C sont lentement ajoutés 22,5 mL d'une solution de nButylLithium à 1,6 M dans le THF (36 mmol ; 1,2 éq.). Le milieu réactionnel est laissé à réagir pendant 30 minutes, avant d'ajouter une solution d'isovaléraldéhyde (2,58 g ; 30 mmol) dans le THF (100 mL). La réaction est laissée à 0 °C sous agitation pendant deux heures. La réaction est suivie par CCM (cyclohexane / acétate d'éthyle : 9 / 1)

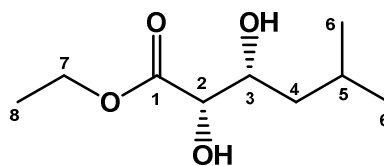
Une fois la réaction terminée, 100 mL d'une solution de  $NH_4Cl$  saturée sont ajoutés, A Après retour à température ambiante, 50 mL d'eau distillée sont ajoutés, puis le THF évaporé en partie. Le milieu réactionnel est extrait trois fois avec 100 mL d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont réunies, séchées sur  $MgSO_4$ , puis évaporées sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur gel de silice éclair (cyclohexane / acétate d'éthyle : 98 / 2). Le composé 51 (3,33g ; 21,35 mmol) est obtenu sous forme d'un liquide translucide avec un rendement de 85 % (rapport E / Z : 99 / 1 déterminé par RMN).

**CCM** :  $R_f$  (cyclohexane / acétate d'éthyle : 9 / 1) = 0,80 ( $KMnO_4$ )

**RMN  $^1H$**  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  : 0,93 (6H ; d ;  $J = 6,59$  ;  $H_6$ ) ; 1,29 (3H ; t ;  $J = 7,14$  Hz ;  $H_8$ ) ; 1,76 (1H ; m ;  $J = 6,77$  et  $6,59$  Hz ;  $H_5$ ) ; 2,09 (2H ; ddd ;  $J = 1,46$  ;  $6,77$  et  $7,5$  Hz ;  $H_4$ ) ; 4,19 (2H ; q ;  $J = 7,14$  Hz ;  $H_7$ ) ; 5,81 (1H ; td ;  $J = 1,46$  et  $15,7$  Hz ;  $H_2$ ) ; 6,94 (1H ; td ;  $J = 7,5$  et  $15,5$  Hz ;  $H_3$ )

**RMN  $^{13}C$**  (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  : 14,25 ( $C_8$ ) ; 22,32 ( $C_6$ ) ; 27,77 ( $C_5$ ) ; 41,43 ( $C_4$ ) ; 60,11 ( $C_7$ ) ; 122,25 ( $C_2$ ) ; 148,24 ( $C_3$ ) ; 166,68 ( $C_1$ )

## Synthèse du (2S,3R)-2,3-dihydroxy-5-methylhexanoate d'éthyle 52



Formule Brute :  $C_9H_{18}O_4$   
Masse Moléculaire : 190,24

Dans un ballon de 100 mL (placé dans un bain d'eau tiède) 7 g d'AD-Mix  $\beta$  sont dissous dans 50 mL d'un mélange eau / *ter*butanol (1/1). Une fois l'AD-Mix dissous, 474 mg de methanesulfonamide (5 mmol) sont ajoutés. Le ballon est ensuite placé à 0 °C avant d'ajouter 780 mg (5 mmol) du composé 51. La réaction est laissée à 0 °C sous très vive agitation pendant 20 heures. La réaction est suivie par CCM (cyclohexane / acétate d'éthyle : 7 / 3).

Une fois la réaction terminée, 6 g de  $Na_2SO_3$  (5 mmol) sont ajoutés. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 30 minutes. L'extraction est réalisée trois fois avec 50 mL d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont regroupées, lavées avec 50mL d'une solution saturée de NaCl, séchées sur  $MgSO_4$ , puis évaporées sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur gel de silice éclair (cyclohexane/acétate d'éthyle : 7/3). Le composé 52 (858 mg ; 4,52 mmol) est obtenu sous forme d'une huile incolore avec un rendement de 90 %.

**CCM** :  $R_f$  (cyclohexane / acétate d'éthyle : 7 / 3) = 0,25 (vanilline)

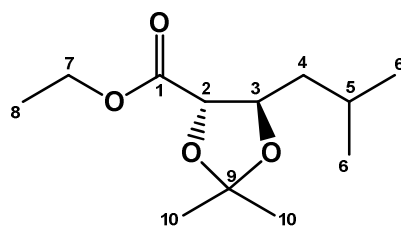
$[\alpha]_D^{21} = + 14.2^\circ$  (c = 1 ;  $CHCl_3$ )

**RMN  $^1H$**  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  : 0,95 (6H ; 2d ; J = 6,59 Hz ;  $H_6$ ) ; 1,32 (3H ; t ; J = 7,14 Hz ;  $H_8$ ) ; 1,37 (1H ; ddd ; J = 4,76 ; 8,42 et 13,91 Hz ;  $H_{4a}$ ) ; 1,58 (1H ; ddd ; J = 5,8 ; 9,2 et 14,1 Hz ;  $H_{4b}$ ) ; 1,79 (1H ; m ;  $H_5$ ) ; 2,43 (2H ; s large ; 2 OH) ; 3,97 (1H ; ddd ; J = 2,2 ; 4,76 et 9,15 Hz ;  $H_3$ ) ; 4,04 (1H ; d ; J = 2,20 Hz ;  $H_2$ ) ; 4,28 (2H ; q ; J = 7,14 Hz ;  $H_7$ )

**RMN  $^{13}C$**  (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  : 14,30 ( $C_8$ ) ; 22,21 ( $C_{6a}$ ) ; 23,35 ( $C_{6b}$ ) ; 24,68 ( $C_5$ ) ; 42,82 ( $C_4$ ) ; 62,24 ( $C_7$ ) ; 70,83 ( $C_3$ ) ; 73,62 ( $C_2$ ) ; 173,79 ( $C_1$ )

**HRMS** : m/z :  $(M+Na)^+$  théorique : 213,1103; mesuré : 213,1099.

## Synthèse du (4S,5R)- 5-isobutyl-2,2-diméthyl-1,3-dioxolane-4-carboxylate d'éthyle 53



Formule Brute : C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub>  
Masse Moléculaire : 230,30

À une solution du composé 52 (800 mg ; 4,21 mmol) dans le dichlorométhane (25 mL) sont ajoutés 2,2 g de 2,2-diméthoxypropane (21,05 mmol ; 5 eq.) et 240 mg d'Amberlyst® 15. La réaction est laissée sous agitation à température ambiante pendant une heure. Le suivi de la réaction est effectué par CCM (cyclohexane / acétate d'éthyle : 8 / 2)

Une fois la réaction terminée, la résine est éliminée par filtration sur verre fritté et le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur gel de silice éclair (cyclohexane / acétate d'éthyle : 95 / 5). Le composé 53 (940 mg ; 4,09 mmol) est obtenu sous forme d'un liquide translucide avec un rendement de 97 %.

CCM : R<sub>f</sub> (CH/AE : 9/1) = 0,54 (vanilline)

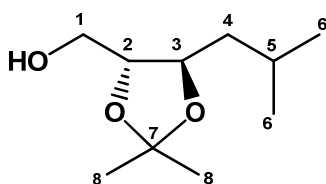
[α]<sub>D</sub><sup>21</sup> = + 28,2° (c = 1 ; CHCl<sub>3</sub>)

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 0,93 (6H ; 2d, J = 6,59 et 6,77 Hz ; H<sub>6</sub>) ; 1,28 (3H ; t ; J = 7,14 Hz, H<sub>8</sub>) ; 1,37 (1H ; ddd ; J = 4,76 ; 8,42 et 13,91 Hz ; H<sub>4a</sub>) ; 1,40 (s, 3H, H<sub>7</sub>) ; 1,46 (s, 3H, H<sub>7</sub>), 1,58 (1H ; ddd ; J = 5,8 ; 9,2 et 14,0 Hz ; H<sub>4b</sub>) ; 1,81 (1H ; m ; H<sub>5</sub>) ; 4,05 (1H ; d ; J = 7,8 Hz ; H<sub>2</sub>) ; 4,16 (1H ; td ; J = 4,77 et 7,8 Hz ; H<sub>3</sub>) ; 4,23 (2H ; q ; J = 7,14 Hz ; H<sub>7</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 14,30 (C<sub>8</sub>) ; 22,13 (C<sub>6a</sub>) ; 23,40 (C<sub>6b</sub>) ; 25,38 (C<sub>5</sub>) ; 25,81 (C<sub>10a</sub>) ; 27,39 (C<sub>10b</sub>) ; 42,83 (C<sub>4</sub>) ; 61,40 (C<sub>7</sub>) ; 77,75 (C<sub>3</sub>) ; 79,73 (C<sub>2</sub>) ; 110,86 (C<sub>9</sub>) ; 171,08 (C<sub>1</sub>)

**HRMS** : m/z : (M+Na)<sup>+</sup> théorique : 253,1416 ; mesuré : 253,1403

### Synthèse du ((4R,5R)-5-isobutyl-2,2-diméthyl-1,3-dioxolan-4-yl)méthanol 54



Formule Brute :  $C_{10}H_{20}O_3$   
Masse Moléculaire : 188,26

À une suspension de  $LiAlH_4$  (225 mg ; 5,85 mmol) dans le THF anhydre (25 ml) placée à 0 °C est lentement additionnée une solution du composé **53** (900 mg ; 3,9 mmol) dans le THF (50 mL). Après l'addition, le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 1 heure. La réaction est suivie par CCM (cyclohexane / acétate d'éthyle : 7 / 3).

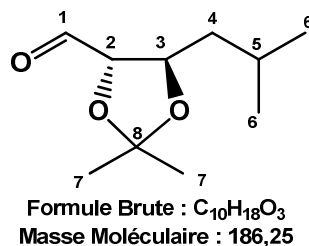
Une fois la réaction terminée, 30 mL d'une solution de  $Na_2SO_4$  saturée sont lentement ajoutés et le précipité obtenu est éliminé par filtration sur célite. L'extraction est réalisée trois fois avec 30 mL d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont réunies, lavées avec 50 mL d'une solution de NaCl saturée, séchées sur  $MgSO_4$ , puis évaporées sous pression réduite.

Le composé **54** (584 mg ; 3,1 mmol) est obtenu sous la forme d'un liquide translucide avec un rendement de 80 % non purifié et engagé directement dans l'étape suivante.

**CCM** :  $R_f$  (cyclohexane / acétate d'éthyle : 7 / 3) = 0,40 (vanilline)

**HRMS** :  $m/z$  :  $(M+Na)^+$  théorique : 211,1310 ; mesuré : 211,1301.

## Synthèse du (4S,5R)-5-isobutyl-2,2-diméthyl-1,3-dioxolane-4-carbaldehyde 55



**Méthode 1 :** par oxydation de l'alcool primaire 54 : À une solution du composé 54 (580 mg ; 3,08 mmol) dans l'acétate d'éthyle (40 mL) sont ajoutés par portions 1,26 g d'acide iodobenzoïque (IBX). Après l'addition, le milieu réactionnel est laissé à reflux (80 °C) sous agitation pendant cinq heures. La réaction est suivie par CCM (cyclohexane / acétate d'éthyle : 8 / 2). Une fois la réaction terminée, le milieu réactionnel est filtré. Le filtrat est lavé avec une solution de NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M (2 x 30 mL) et une solution saturée de NaCl (2 x 30 mL). La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub> et évaporée sous pression réduite. Le résidu est purifié sur gel de silice éclair (cyclohexane / acétate d'éthyle : 8 / 2). Le composé 55 (493 mg ; 2,65 mmol) est obtenu sous la forme d'une huile incolore avec un rendement de 86 %.

**Méthode 2 :** par coupure oxydante du diol 58 : Dans un ballon monocol est introduit 0,244 g (2 éq.) de NaIO<sub>4</sub> supporté sur SiO<sub>2</sub> (0,116g de NaIO<sub>4</sub> par mL de mélange NaIO<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>) en suspension dans 4 mL de dichlorométhane. Dans un autre ballon monocol, 0,125g de composé 58 (0,0005 mol) est dissous dans 4 mL de dichlorométhane. Cette dernière solution est versée goutte à goutte à l'aide d'une ampoule de coulée sur la suspension NaIO<sub>4</sub> / SiO<sub>2</sub> précédente, sous agitation et à température ambiante. Après 30 minutes, la réaction est terminée (suivi CCM). Le mélange est filtré sur verre fritté puis lavé trois fois au dichlorométhane avant évaporation à sec .Le produit 59 est obtenu sous la forme d'une huile incolore, sans purification particulière, avec un rendement de 93 % (0,087 g).

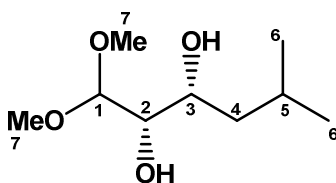
**CCM :** R<sub>f</sub> (cyclohexane / acétate d'éthyle : 8 / 2) = 0,22 (vanilline)

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 9,70 (d ; J = 2,5 Hz ; 1H ; H<sub>1</sub>) ; 4,09 (ddd ; J = 4,1 ; 7,7 et 8,7 Hz ; 1H ; H<sub>3</sub>) ; 3,88 (dd ; J = 2,5 et 7,7 Hz ; 1H ; H<sub>2</sub>) ; 1,78 (m ; 1H ; H<sub>5</sub>) ; 1,60 (ddd ; J = 6,0 ; 8,7 et 13,7 Hz ; 1H ; H<sub>4'</sub>) ; 1,46 (s ; 3H ; H<sub>7</sub>) ; 1,45 (m ; 1H ; H<sub>4</sub>) ; 1,40 (s ; 3H ; H<sub>7'</sub>) ; 0,92 (d ; J = 6,8 Hz ; 3H ; H<sub>6</sub>) ; 0,91 (d ; J = 6,8 Hz ; 3H ; H<sub>6'</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 22,06 (C<sub>6a</sub>) ; 23,14 (C<sub>6b</sub>) ; 25,20 (C<sub>5</sub>) ; 26,17 (C<sub>8a</sub>) ; 27,19 (C<sub>8b</sub>) ; 42,34 (C<sub>4</sub>) ; 75,32 (C<sub>3</sub>) ; 85,25 (C<sub>2</sub>) ; 110,91 (C<sub>7</sub>) ; 201,15 (C<sub>1</sub>)

**HRMS :** [M+CH<sub>3</sub>OH+Na] calculée : 241,23 ; trouvée: 241,19.

## Synthèse du (2S,3R)-1,1-dimethoxy-5-methylhexane-2,3-diol **56**



Formule Brute : C<sub>9</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub>  
Masse Moléculaire : 192,25

À une solution du composé **55** (400 mg ; 2,13 mmol) dans le méthanol anhydre (25 mL) sont ajoutés 16 mg d'iode (0,064 mmol). La réaction est laissée sous agitation au reflux du méthanol pendant 3 heures. La réaction est suivie par CCM (cyclohexane / acétate d'éthyle : 5 / 5).

Une fois la réaction terminée, 16 mg de NaS<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.5H<sub>2</sub>O (0,065 mmol) sont ajoutés après retour à température ambiante. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant une heure, puis le méthanol est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice éclair (cyclohexane / acétate d'éthyle : 6 / 4). Le composé **56** (280 mg ; 1,46 mmol) est obtenu sous la forme d'une huile incolore avec un rendement de 69 %.

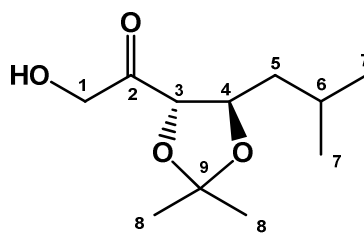
**CCM** : R<sub>f</sub> (cyclohexane / acétate d'éthyle : 5 / 5) = 0,27 (vanilline)

**[α]<sub>D</sub><sup>21</sup>** = - 5,1° (c = 1,1 ; CHCl<sub>3</sub>)

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 0,94 (6H ; 2d ; J = 6,59 et 6,77 Hz ; H<sub>6</sub>) ; 1,28 (1H ; ddd ; J = 4,76 ; 8,42 et 13,36 Hz ; H<sub>4a</sub>) ; 1,57 (1H ; ddd ; J = 5,67 ; 9,15 et 13,72 Hz ; H<sub>4b</sub>) ; 1,78 (1H ; m ; J = 6,59 ; 6,77 et 8,42 Hz ; H<sub>5</sub>) ; 3,32 (1H ; t ; J = 1,65 Hz ; H<sub>2</sub>) ; 3,43 (6H ; 2s ; H<sub>7</sub>) ; 3,79 (1H ; ddd ; J = 2,01 ; 4,76 et 9,15 ; H<sub>3</sub>) ; 4,4 ( 1H ; d ; J = 6,95 Hz ; H<sub>1</sub>)

**RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ : 22,49 (C<sub>6a</sub>) ; 23,77 (C<sub>6b</sub>) ; 25,52 (C<sub>5</sub>) ; 43,90 (C<sub>4</sub>) ; 54,47 (C<sub>7a</sub>) ; 55,89 (C<sub>7b</sub>) ; 69,43 (C<sub>3</sub>) ; 74,11 (C<sub>2</sub>) ; 106,35 (C<sub>1</sub>)

## Synthèse du 2-hydroxy-1-((4S,5R)-5-isobutyl-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)ethanone 57



Formule brute:  $C_{11}H_{20}O_4$   
Masse moléculaire: 216,14

Dans un ballon monocol, 0,230 mg de composé 3 (0,001 mol) est dissous dans 2 mL d'acétone. 0,192 g (0,001 mole, 0,9 éq.) d'APTS sont ajoutés ainsi que 0,029 g de tamis moléculaire 4 Å. Le mélange est agité pendant 5 heures à température ambiante. Après la disparition totale du produit de départ (suivi CCM), le mélange est filtré sur verre fritté puis évaporé à sec. Le produit est purifié par chromatographie sur gel de silice éclair (cyclohexane / acétate d'éthyle : 9 / 1). Le produit 57 (0,181 mg) est obtenu avec un rendement de 84 % sous forme d'une huile incolore.

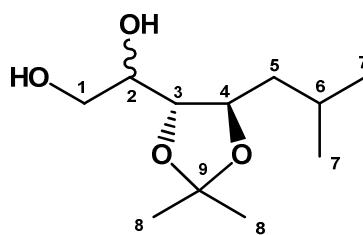
**CCM** : Rf (cyclohexane / acétate d'éthyle : 9 / 1) = 0,2 (vanilline)

**RMN  $^1H$**  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 4,57 (d ; J = 19,4 Hz ; 1H ;  $H_1$ ) ; 4,49 (d ; J = 19,4 Hz ; 1H ;  $H_{1'}$ ) ; 4,07 (d ; J = 8,2 Hz ; 1H ;  $H_3$ ) ; 4,01 (dt ; J = 8,2 ; 4 ; 1 Hz ; 1H ;  $H_4$ ) ; 2,96 (s ; 1H ; OH) ; 1,82 (m ; 1H ;  $H_6$ ) ; 1,58 (m ; 1H ;  $H_5$ ) ; 1,44 (s ; 1H ; 3H ;  $H_8$ ) ; 1,42 (m ; 1H ;  $H_{5'}$ ) ; 1,41 (s ; 1H ; 3H ;  $H_{8'}$ ) ; 0,95 (d ; J = 6,6 Hz ; 3H ;  $H_7$ ) ; 0,91 (d ; J = 6,6 Hz ; 3H ;  $H_{7'}$ ).

**HRMS**  $[M+Na]$  calculée : 239,25 ; trouvée : 239,12



## Synthèse du 1-((4R,5R)-5-isobutyl-2,2-diméthyl-1,3-dioxolan-4-yl)éthane-1,2-diol 58



Formule brute:  $C_{11}H_{22}O_4$   
Masse moléculaire: 218,15

Dans un ballon monocol, 0,160 g de composé 57 (0,0007 mol) est dissout dans 16 mL d'éthanol absolu. 0,041 g (0,001 mol ; 1,5 équ.) de  $NaBH_4$  sont alors ajoutés sous agitation à 0 °C. L'avancement de la réaction est suivi par CCM (cyclohexane / acétate d'éthyle : 6 / 4). La réaction est immédiate et totale. Le mélange est alors évaporé à sec, 30 mL d'eau sont ajoutés et la solution est extraite avec 3 fois 30 mL d'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée sur  $MgSO_4$  puis le solvant est évaporé sous vide. Le composé 58 (125 mg) est obtenu sans purification sous forme d'une huile incolore avec un rendement de 82 %, en mélange de deux épimères en position 2 (numérotés n pour l'un et n' pour l'autre)

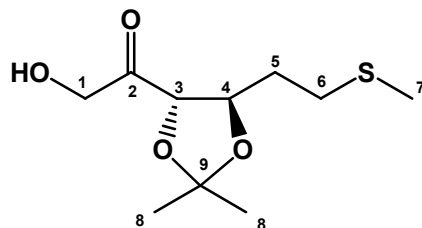
**CCM :** Rf (cyclohexane / acétate d'éthyle : 6 / 4) = 0,3 (vanilline)

**RMN  $^1H$**  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm) : 4,11 (dt ; J = 3,2 ; 9,2 Hz ; 1H ;  $H_2$ ) ; 4,03 (ddd ; J = 2,8 ; 7,6 et 10 Hz ; 1H ;  $H_2'$ ) ; 3,9 – 3,5 (m ; 4H ;  $2H_1 + H_3 + H_4$  et  $2H_1' + H_3' + H_4'$ ) ; 2,12 (s ; 1H ; OH) ; 1,82 (m ; 1H ;  $H_6$  et  $H_6'$ ) ; 1,53 (ddd ; J = 5,5 ; 9,2 et 14,7 Hz ; 2H ;  $H_5$ ) ; 1,45 – 1,2 (m ; 8H ;  $H_8$  et  $H_5'$ ) ; 0,95 (m ; 6H ;  $H_7$  et  $H_7'$ ).

**RMN  $^{13}C$**  (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm) : 108,9 ( $C_9$ ) ; 108,7 ( $C_9'$ ) ; 82,1 ( $C_3$ ) ; 81,5 ( $C_3'$ ) ; 77,4 ( $C_4'$ ) ; 75,4 ( $C_4$ ) ; 72,6 ( $C_2'$ ) ; 69,8 ( $C_2$ ) ; 65,0 ( $C_1$ ) ; 63,8 ( $C_1'$ ) ; 43,2 ( $C_5'$ ) ; 41,9 ( $C_5$ ) ; 27,4 ( $C_{8a}$ ) ; 27,3 ( $C_{8a}'$ ) ; 26,9 ( $C_{8b}$ ) ; 26,7 ( $C_{8b}'$ ) ; 25,4 ( $C_6'$ ) ; 25,3 ( $C_6$ ) ; 23,6 ( $C_{7a}'$ ) ; 23,4 ( $C_{7a}$ ) ; 21,9 ( $C_{7b}$ ) ; 21,7 ( $C_{7b}'$ ).

**HRMS:**  $[M+ Na]$  calculée : 241,27 ; trouvée : 241,13.

**Synthèse du 1-((4S,5R)-2,2-diméthyl-5-(2-(méthylthio)éthyl)-1,3-dioxolan-4-yl)-2-hydroxyéthanone 59**



**Formule brute:** C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>S  
**masse moléculaire:** 234,09

Dans un ballon monocol, 0,210 g de composé 4 (0,001 mol) est dissous dans 5,2 mL d'acétone. 0,288 g (0,0015 mol ; 1,5 éq.) d'APTS sont ajoutés ainsi que 0,02 g de tamis moléculaire 4 Å. Le mélange est agité pendant 5 heures à température ambiante. Après la disparition totale du produit de départ (suivi CCM), le mélange est filtré sur verre fritté puis évaporé à sec. Le produit est purifié par chromatographie sur gel de silice éclair (cyclohexane / acétate d'éthyle : 9 / 1). Le produit 59 (m = 0,148 g) est obtenu avec un rendement de 63 % sous la forme d'une huile incolore.

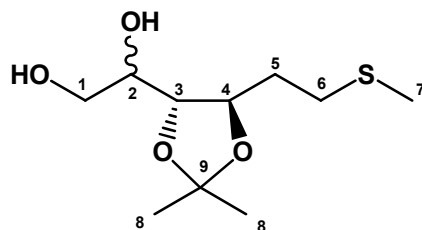
**CCM :** R<sub>f</sub> (cyclohexane / acétate d'éthyle : 9 / 1) = 0,2 (vanilline)

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) : 4,55 (d ; J = 20,6 Hz ; 1H ; H<sub>1</sub>) ; 4,48 (d ; J = 20,6 Hz ; 1H ; H<sub>1'</sub>) ; 4,14 (d ; J = 8,2 Hz ; 1H ; H<sub>3</sub>) ; 4,08 (dt ; J = 3,4 et 8,2 Hz ; 1H ; H<sub>4</sub>) ; 2,85 (se ; 1H ; OH) ; 2,66 (ddd ; J = 13,5 ; 8,7 et 5,2 Hz ; 1H ; H<sub>6</sub>) ; 2,56 (td ; J = 13,5 et 8,0 Hz ; 1H ; H<sub>6'</sub>) ; 2,07 (s ; 3H ; H<sub>7</sub>) ; 2,05 (m ; 1H ; H<sub>5</sub>) ; 1,91 (dtd ; J = 13,7 ; 8,0 et 5,2 Hz ; 1H ; H<sub>5'</sub>) ; 1,42 (s ; 3H ; H<sub>8</sub>) ; 1,39 (s ; 3H ; H<sub>8'</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) : 209,2 (C<sub>2</sub>) ; 110,9 (C<sub>9</sub>) ; 83,4 (C<sub>3</sub>) ; 76,8 (C<sub>4</sub>) ; 66,2 (C<sub>1</sub>) ; 32,8 (C<sub>6</sub>) ; 30,1 (C<sub>5</sub>) ; 27,1 (C<sub>8</sub>) ; 26,1 (C<sub>8'</sub>) ; 15,4 (C<sub>7</sub>).

**HRMS:** [M+ Na] calculée: 257,29 ; trouvée : 257,08.

**Synthèse du 1-((4R,5R)-2,2-diméthyl-5-(2-(méthylthio)éthyl)-1,3-dioxolan-4-yl)éthane-1,2-diol 60**



**Formule brute:** C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub>S  
**Masse moléculaire:** 236,11

Dans un ballon monocol, 0,117 g de composé **59** (0,0007 mol) est dissout dans 16 mL d'éthanol absolu. 0,028 g (0,001 mol ; 1,5 éq.) de NaBH<sub>4</sub> sont alors ajoutés sous agitation à 0 °C. L'avancement de la réaction est suivi par CCM (cyclohexane / acétate d'éthyle: 6 / 4). La réaction est immédiate et totale. Le mélange est alors évaporé à sec, 30 mL d'eau sont ajoutés et la solution est extraite avec 3 fois 30 mL d'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub> puis le solvant est évaporé sous vide. Le composé **60** (122 mg) est obtenu sans purification sous forme d'une huile incolore avec un rendement de 76 %, en mélange de deux épimères en position 2 (numérotés n pour l'un et n' pour l'autre)

**CCM :** R<sub>f</sub> (cyclohexane / acétate d'éthyle : 6 / 4) = 0,2 (vanilline)

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) : 4,15 – 3,55 (m ; 5H ; 2H<sub>1</sub> + H<sub>2</sub> + H<sub>3</sub> + H<sub>4</sub> et 2H<sub>1'</sub> + H<sub>2'</sub> + H<sub>3'</sub> + H<sub>4'</sub>) ; 2,79 (se ; 1H ; OH) ; 2,73 – 2,50 (m ; 2H ; H<sub>6a</sub> et H<sub>6a'</sub>) ; 2,09 (s ; 3H ; H<sub>7</sub> et H<sub>7'</sub>) ; 2,07 – 1,75 (m ; 2H ; H<sub>6b</sub> et H<sub>6b'</sub>) ; 1,38 (s ; 3H ; H<sub>8a</sub> et H<sub>8b</sub>) ; 1,36 (s ; 3H ; H<sub>8a'</sub>) ; 1,35 (s ; 3H ; H<sub>8b'</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) : 109,2 (C<sub>9</sub>) ; 108,9 (C<sub>9'</sub>) ; 81,5 (C<sub>3</sub>) ; 80,6 (C<sub>3'</sub>) ; 78,1 (C<sub>4'</sub>) ; 75,8 (C<sub>4</sub>) ; 72,8 (C<sub>2'</sub>) ; 69,9 (C<sub>2</sub>) ; 64,7 (C<sub>1</sub>) ; 63,9 (C<sub>1'</sub>) ; 33,7 (C<sub>6'</sub>) ; 32,6 (C<sub>6</sub>) ; 30,6 (C<sub>5'</sub>) ; 30,5 (C<sub>5</sub>) ; 27,3 (C<sub>8a</sub>) ; 27,2 (C<sub>8a'</sub>) ; 26,9 (C<sub>8b'</sub>) ; 26,8 (C<sub>8b</sub>) ; 15,5 (C<sub>7</sub>) ; 15,4 (C<sub>7'</sub>).

**HRMS:** [M+ Na] calculée: 259,21 ; trouvée : 259,09.

# ENZYMOLOGIE

## Matériel

### *Enzymes, coenzymes et substrats*

Les enzymes utilisées sont commercialisées par la société Sigma Chemical Co. Elles sont soit sous forme lyophilisée soit sous forme de suspension dans le sulfate d'ammonium (les activités indiqués correspondent à l'activité spécifique):

- fructose-1,6-bisphosphate aldolase de muscle de lapin (RAMA) :  $11 \text{ U.mg}^{-1}$
- $\alpha$ -glycérophosphate déshydrogénase ( $\alpha$ -GDPH) / triose phosphate isomérase (TPI) de muscle de lapin :  $160 \text{ U.mg}^{-1}$  ( $\alpha$ -GDPH) et  $1500 \text{ U.mg}^{-1}$  (TPI)
- $\alpha$ -GPDH de muscle de lapin :  $260 \text{ U.mg}^{-1}$
- Alcool déshydrogénase de levure de boulanger (ADH) :  $547 \text{ U.mg}^{-1}$ .
- L-lactate déshydrogénase (LDH)

Les différents substrats (la dihydroxyacétone, le L-érythrulose, le D-glycéraldéhyde-3-P, le D-fructose-1,6-bisphosphate et le D-ribose-5-phosphate, ), le NADH,  $\text{H}^+$ ,  $\text{MgCl}_2$ , le ThDP sont commercialisés par la Société Sigma Chemical Co. Le L-érythrulose nous a été donné généreusement par Pentapharm (Suisse). Le DHAP est préparé selon la méthode développée par Wong<sup>157</sup>.

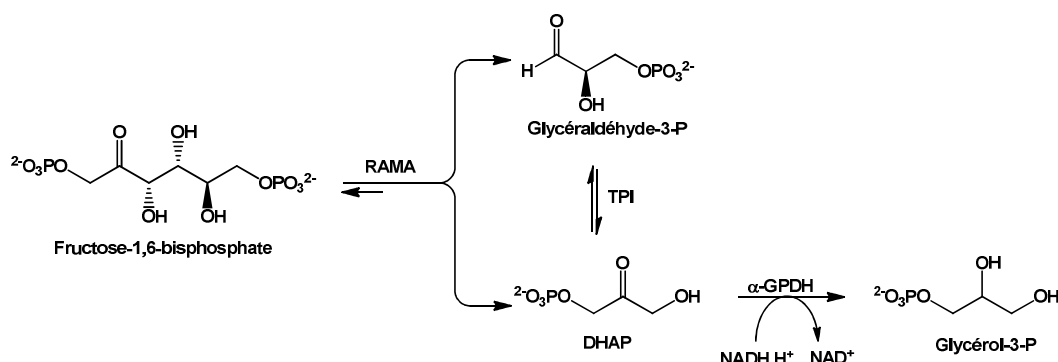
### *Analyses spectroscopiques*

Les dosages par spectrophotométrie d'absorption ont été effectués sur un spectrophotomètre HITACHI U-2010.

Les analyses par LC-MS ont été effectuées sur une chaîne HPLC Waters® Alliance 2695 couplée à un spectromètre de masse Micromass Q-TOF comportant une source electrospray de type Z-spray (les températures de la source et de la désolvation sont de  $100^\circ\text{C}$  et  $250^\circ\text{C}$  respectivement). La colonne chromatographique utilisée est une colonne à interactions hydrophile Zic®- Hilic de marque SeQuant AB (2,1 mm x 100 mm ; taille des particules :  $5 \mu\text{m}$ ). L'équilibration de la colonne a été effectuée au moyen d'un éluant binaire acétonitrile / acétate d'ammonium 50 mM (3/1) à  $0,25 \text{ mL.min}^{-1}$  pendant 5 heures (soit 20 mL d'éluant). Les analyses ont été réalisées en conditions isocratiques en utilisant le même éluant

## Méthodes

### 1. Test d'activité de la fructose-1,6-bisphosphate aldolase (RAMA)



Dans une cuve spectrophotométrique (1mL), sont introduits :

- 930  $\mu\text{L}$  de tampon triéthanolamine-HCl (TEA) à 0,1 M pH 7,5
- 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{NADH, H}^+$  ( $10 \text{ mg.mL}^{-1}$ )
- 30  $\mu\text{L}$  de fructose-1,6-bisphosphate ( $30 \text{ mg.mL}^{-1}$ )
- 10  $\mu\text{L}$  de  $\alpha$ -GPDH, TPI (2 U  $\alpha$ -GDH, 21 U TPI)
- 0,02 U de RAMA (volume standard de l'échantillon à doser : 20  $\mu\text{L}$ )

L'absorbance (A) de l'échantillon est mesurée et enregistrée pendant 10 minutes à 340 nm. La pente ( $\Delta A/\Delta t$ ) mesurée correspond à la quantité de  $\text{NADH, H}^+$  consommée lors de la réduction par la  $\alpha$ -glycérophosphate déshydrogénase. L'activité de la RAMA est obtenue en appliquant l'équation suivante :

$$\text{Activité} = \frac{\Delta A}{\Delta t} \times \frac{V_{\text{cuve}}}{V_{\text{RAMA}} \times \epsilon_{\text{NADH}}} \times 10^3$$

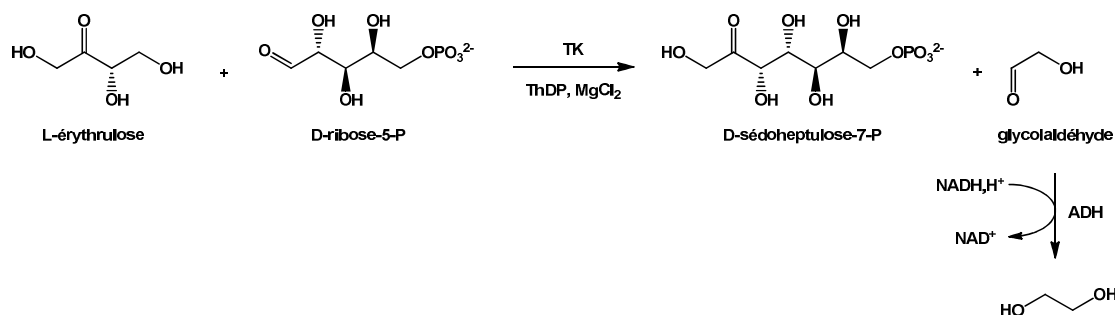
où l'activité est exprimée en  $\text{U.mL}^{-1}$  ( $\mu\text{mol de substrat formé.min}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ ) ;  $\Delta t$  en min ;  $V_{\text{cuve}}$  et  $V_{\text{RAMA}}$  en mL. La valeur du coefficient d'extinction molaire  $\epsilon_{\text{NADH, H}^+}$  est de  $6220 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ .

L'activité spécifique est obtenue en appliquant l'équation suivante :

$$\text{Activité spécifique} = \frac{\text{Activité}}{[\text{protéines-totales}]}$$

où l'activité spécifique est exprimée en  $\text{U.mg}^{-1}$  de protéines ; Activité totale en  $\text{U.mL}^{-1}$  et la concentration de protéines totales en  $\text{mg.mL}^{-1}$ .

## 2. Test d'activité de la transcétolase (TK)



Dans une cuve spectrophotométrique (1mL), sont introduits :

- 800 µL de tampon glycyl-glycine 0,1 M pH 7,5
- 20 µL de NADH, H<sup>+</sup> (10 mg.mL<sup>-1</sup>),
- 5 µL de ThDP (10 mg.mL<sup>-1</sup>),
- 10 µL de MgCl<sub>2</sub> (10 mg.mL<sup>-1</sup>),
- 100 µL de L-érythrulose (120 mg.mL<sup>-1</sup>),
- 50 µL de D-ribose-5-phosphate (50 mg.mL<sup>-1</sup>),
- 5 µL d'ADH (5000 U.mL<sup>-1</sup>),
- 10 µL de TK (V<sub>TK</sub>) (4 mg.mL<sup>-1</sup>)

La diminution de l'absorbance est mesurée à 340 nm pendant 10 minutes. La pente  $\Delta A/\Delta t$  mesurée correspond à la quantité de NADH, H<sup>+</sup> consommée lors de la réduction du glycaldéhyde par l'ADH. L'activité de la TK est calculée en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Activité} = \frac{\Delta A}{\Delta t} \times \frac{V_{\text{cuve}}}{V_{\text{TK}} \times \epsilon_{\text{NADH}}} \times 10^3$$

où l'activité est exprimé en U.mL<sup>-1</sup> (µmol de substrat formée.min<sup>-1</sup>.mL<sup>-1</sup>),  $\Delta t$  en minutes,  $V_{\text{cuve}}$  et  $V_{\text{TK}}$  en mL. La valeur du coefficient d'extinction molaire ( $\epsilon_{\text{NADH}}$ ) est 6220 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>.

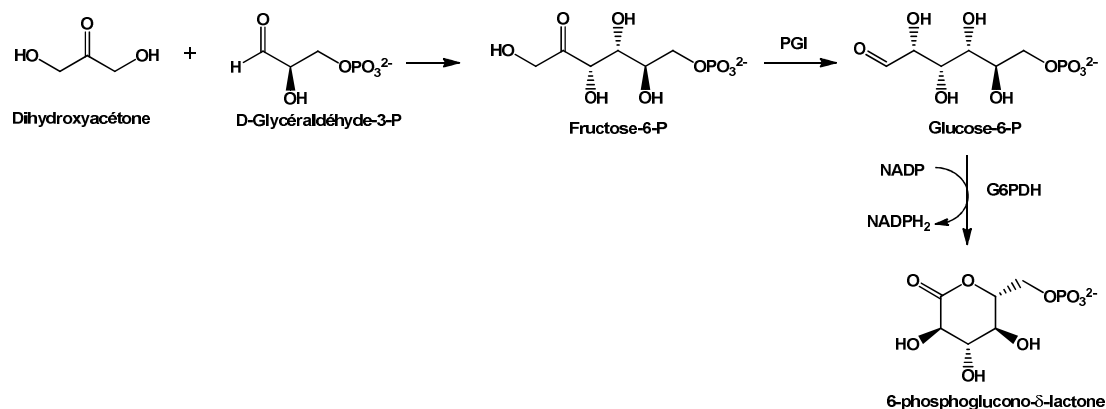
Le L-érythrulose n'est pas le substrat naturel de l'enzyme. Il a été établi que l'activité de la TK ne représente que 30 % de l'activité mesurée en présence de D-xylulose-5-phosphate (substrat naturel).

Il est possible de déterminer l'activité spécifique de la TK selon l'équation suivante :

$$\text{Activité spécifique} = \frac{\text{Activité}}{[\text{protéines-totales}]}$$

où l'activité spécifique est exprimée en U.mg<sup>-1</sup> de protéines, Activité en U.mL<sup>-1</sup> et la concentration de protéines totales en mg.mL<sup>-1</sup>.

### 3. Test d'activité de la fructose-6-phosphate aldolase A129S (FSA A129S)



Dans une cuve spectrophotométrique (1mL), sont introduits :

- 940  $\mu\text{L}$  de tampon GlyGly à 50 mM pH 8,5 (DTT 1 mM),
- 10  $\mu\text{L}$  de DHA (5 M),
- 10  $\mu\text{L}$  de D-G3P (solution commerciale 223 mM),
- 10  $\mu\text{L}$  de NADP (50 mM),
- 10  $\mu\text{L}$  de PGI (18 U),
- 10  $\mu\text{L}$  de G6PDH (5 U),
- 10  $\mu\text{L}$  de FSA (0,2  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ).

L'absorbance (A) de l'échantillon est mesurée et enregistrée pendant 10 minutes à 340 nm. La pente ( $\Delta A / \Delta t$ ) mesurée correspond à la quantité de  $\text{NADPH}_2$  formée lors de l'oxydation par la glucose-6-P déshydrogénase. L'activité de la FSA est obtenue en appliquant l'équation suivante :

$$\text{Activité} = \frac{\Delta A}{\Delta t} \times \frac{V_{\text{cuve}}}{V_{\text{FSA}} \times \epsilon_{\text{NADPH}_2}} \times 10^3$$

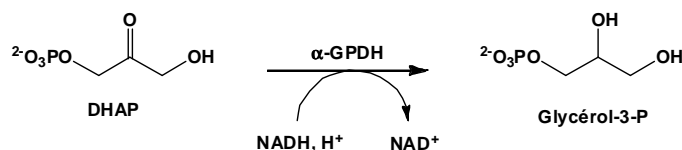
où l'activité est exprimée en  $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $\mu\text{mol}$  de substrat formé. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) ;  $\Delta t$  en min ;  $V_{\text{cuve}}$  et  $V_{\text{FSA}}$  en mL. La valeur du coefficient d'extinction molaire  $\epsilon_{\text{NADPH}_2}$  est de  $6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

L'activité spécifique est obtenue en appliquant l'équation suivante :

$$\text{Activité spécifique} = \frac{\text{Activité}}{[\text{protéines totales}]}$$

où l'activité spécifique est exprimée en  $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$  de protéines ; Activité totale en  $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$  et la concentration de protéines totales en  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

#### 4. Dosage de la DHAP



Dans une cuve spectrophotométrique (1mL), sont introduits :

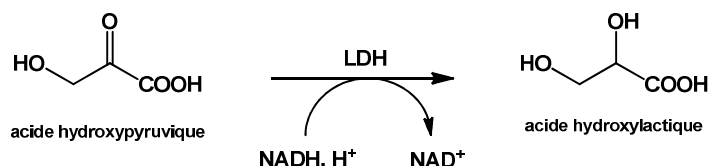
- 960  $\mu\text{L}$  de tampon TEA 0,1 M, pH 7,5
- 10  $\mu\text{L}$  de NADH,  $\text{H}^+$  (10  $\text{mg.mL}^{-1}$ )
- 10  $\mu\text{L}$  de  $\alpha\text{-GPDH}$  (200  $\text{U.mL}^{-1}$ )
- 20  $\mu\text{L}$  d'échantillon à doser (dilution au  $1/20^{\text{e}}$ )

Une mesure de l'absorbance est effectuée à 340 nm avant l'ajout de l'échantillon à doser. La valeur trouvée est notée  $A_i$ . La solution de DHAP à doser diluée ou non diluée ( $V_{\text{échantillon}}$ ) est ensuite introduite. Après stabilisation, l'absorbance notée  $A_f$  est mesurée. La concentration du DHAP est donnée par l'équation suivante :

$$[\text{DHAP}] = \frac{(A_f - A_i) \times V_{\text{cuve}}}{V_{\text{échantillon}} \times \epsilon_{\text{NADH}}} \times 10^3$$

où [DHAP] est exprimée en mM,  $V_{\text{cuve}}$  et  $V_{\text{échantillon}}$  en mL et où la valeur du coefficient d'extinction molaire ( $\epsilon_{\text{NADH}}$ ) est de  $6220 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ .

#### 5. Dosage du HPA



Dans une cuve spectrophotométrique (1mL), sont introduits :

- 960  $\mu\text{L}$  de tampon TEA 0,1 M, pH 7,5
- 10  $\mu\text{L}$  de NADH,  $\text{H}^+$  (10  $\text{mg.mL}^{-1}$ )
- 10  $\mu\text{L}$  de LDH (500  $\text{U.mL}^{-1}$ )
- 20  $\mu\text{L}$  d'échantillon à doser (dilution au  $1/20^{\text{e}}$ )

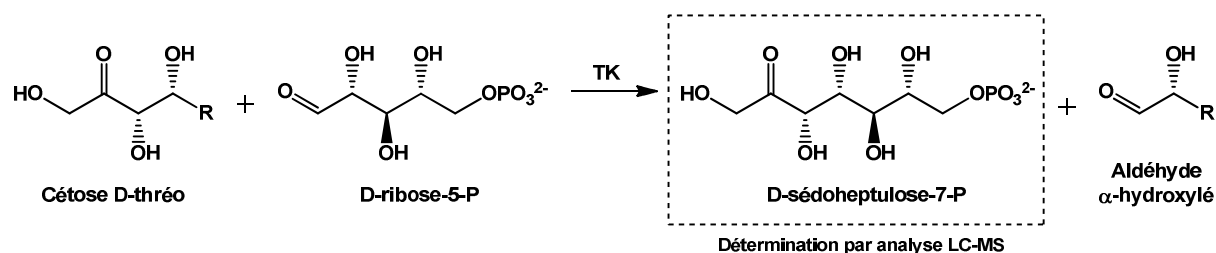
Une mesure de l'absorbance est effectuée à 340 nm avant l'ajout de l'échantillon à doser. La valeur trouvée est notée  $A_i$ . La solution de DHAP à doser diluée ou non diluée ( $V_{\text{échantillon}}$ ) est ensuite introduite. Après stabilisation, l'absorbance notée  $A_f$  est mesurée. La concentration en HPA est donnée par l'équation suivante :



$$[HPA] = \frac{(A_f - A_i) \times V_{cuve}}{V_{\text{échantillon}} \times \epsilon_{NADH}} \times 10^3$$

où [HPA] est exprimée en mM,  $V_{cuve}$  et  $V_{\text{échantillon}}$  en mL et où la valeur du coefficient d'extinction molaire ( $\epsilon_{NADH}$ ) est de  $6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

## 6. Détermination de l'activité de la TK par LC-MS



### 6.1. Gamme étalon pour le sédoheptulose-7-P

La gamme étalon a été réalisée à partir de D-sédohéptulose-7-P préparé au laboratoire<sup>110</sup> La solution mère de sédoheptulose-7-P a été préparée selon la méthode suivante : 26 mg de sédoheptulose-7-P (pureté 65 % sous forme de sel de barium) ont été dissous dans 2 mL d'eau ultrapure en présence de résine Dowex  $\text{Na}^+$ . Après centrifugation, 1 mL de surnageant ont été dilué dans 1 mL de tampon acétate d'ammonium ( $\text{AcONH}_4$ ) à 100 mM afin d'obtenir une solution de sédoheptulose-7-P à 10 mM dans 50 mM d' $\text{AcONH}_4$ . La gamme de concentration (1000, 250, 100 et 25 pmoles) a été réalisée par dilution en cascade dans le tampon  $\text{AcONH}_4$  50 mM à partir de la solution mère.

### 6.2. Conditions standard des réactions

Dans un eppendorf de 2 mL, sont introduits (toutes les solutions sont préparées dans le tampon  $\text{AcONH}_4$  50 mM) :

- 333  $\mu\text{L}$  d'une solution de cétose ( 0 ; 9 ; 30 ou 100 mM)
- 100  $\mu\text{L}$  d'une solution de  $\text{MgCl}_2$  à 30 mM
- 100  $\mu\text{L}$  d'une solution de ThDP à 20 mM
- 333  $\mu\text{L}$  d'une solution de D-ribose-5-P à 30 mM
- 100  $\mu\text{L}$  d'un solution de TK à  $20 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  (extrait liquide brut)
- $\text{AcONH}_4$  50 mM qsp 1mL

Des prélèvements ont été effectués à différents temps de réaction : 0 ; 3 ; 5 ; 7 heures et traités selon les conditions indiqués ci-dessous.

### 6.3. Préparation standard des échantillons à doser

Chaque échantillon soumis au dosage du sédoheptulose-7-P (gamme étalon ou prélèvement de milieu réactionnel) est préparé de la façon suivante. Pour 40  $\mu\text{L}$  de solution à doser, on ajoute 40  $\mu\text{L}$  d'une solution d'  $\alpha$ -glycérophosphate à 10 mM (étalon interne) et 320  $\mu\text{L}$  d'eau ultrapure. Après 5 minutes de centrifugation à 14000 rpm, 800  $\mu\text{L}$  d'acétonitrile sont ajouté à 200  $\mu\text{L}$  de surnageant pour obtenir un échantillon destiné à l'injection en LC-MS. Le volume injecté est de 5  $\mu\text{L}$ .



# MICROBIOLOGIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE

## Matériel

### *Préparation des milieux de cultures*

Tous les milieux de culture sont stérilisés en autoclave avant utilisation. Les solutions d'acides aminés et d'antibiotiques sont préparées dans l'eau osmosée et stérilisées par filtration sur filtre Millipore® 0,22 µm. Les milieux gélosés sont obtenus par ajout d'Agar (Difco®) à une concentration de 15 g.L<sup>-1</sup>. Les antibiotiques sont ajoutés aux concentrations suivantes : Carbenicilline 100 mg.L<sup>-1</sup>, Chloramphénicol 25 mg.L<sup>-1</sup>, Kanamycine : 30 mg.L<sup>-1</sup>.

### *Composition des milieux de cultures*

#### ➤ Milieu *S. cerevisiae* H402(pTKL1) : Milieu SC + Galactose

Galactose	20 g	L-tyrosine	30 mg
Yeast Nitrogène Base	6,7 g	L-isoleucine	30 mg
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5,04 g	L-lysine	30 mg
L-tryptophane	20 mg	L-phénylalanine	50 mg
L-histidine	20 mg	L-glutamate	100 mg
L-arginine	20 mg	L-valine	150 mg
L-méthionine	20 mg	L-sérine	400 mg
L-thréonine	20 mg	H <sub>2</sub> O distillée	qsp 1 L

#### ➤ Milieu LB

Tryptone	10 g
Yeast Extract	10 g
NaCl	5 g
H <sub>2</sub> O osmosée	qsp 1L

➤ Milieu MS

- Composition du milieu MS :

Acide citrique, H <sub>2</sub> O	840 mg
MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	250 mg
NH <sub>4</sub> Cl	1,06 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>3</sub> , 3 H <sub>2</sub> O	11,41 g
NTA Mix	1 mL
H <sub>2</sub> O osmosée	qsp 1L

- Composition du NTA Mix :

Acide nitrilotriacétique	1,91 g	CoCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	70 mg
CaCl <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O	450 mg	CuCl <sub>2</sub> , 6 H <sub>2</sub> O	50 mg
FeCl <sub>3</sub> , 6 H <sub>2</sub> O	810 mg	Ni <sub>2</sub> Cl, 6 H <sub>2</sub> O	70 mg
MnCl <sub>2</sub> , 4 H <sub>2</sub> O	200 mg	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2 H <sub>2</sub> O	70 mg
ZnCl <sub>2</sub>	40 mg	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> , 5H <sub>2</sub> O	80 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	20 mg	H <sub>2</sub> O osmosée	qsp 1 L
CrCl <sub>3</sub> , 6 H <sub>2</sub> O	80 mg		

- Complémentation du milieu MS :

Les acides aminés nécessaires sont ajoutés au milieu MS à la concentration de 0,3 mM. Le milieu de culture des cellules dépourvues de gènes de transcétolase est complété par un 1/50<sup>ème</sup> de la solution suivante (solution Aro Shi B6):

Tyrosine	272 mg	Acide Shikimique	261 mg
Phénylalanine	248 mg	Pyridoxine	4 mg
Tryptophane	306 mg	H <sub>2</sub> O osmosée	qsp 100 mL

## **Méthodes**

### **1. Production de TK *S. cerevisiae* dans *S. cerevisiae***

La souche H402 (pTKL1) nous a été donnée par le Pr. Schneider (Institut Karolinska-Stockholm, Suède).

#### **1.1. Conditions de culture de la souche de *S. cerevisiae* H402 (pTKL1)**

La souche H402 (pTKL1) est cultivée dans 10 mL de milieu SC à 30 °C pendant 48 heures sous agitation. La production de TK est réalisée en milieu SC liquide dans des erlenmeyers de 500 mL contenant 100 mL de milieu SC et 1,5 mL de préculture. Le milieu est incubé 40 heures à 30 °C sous agitation. Les levures sont récupérées par centrifugation à 2000 g pendant 5 minutes à 4 °C et conservées à – 80 °C. Le rendement de la culture est de 10 g de cellules (poids humide) par litre de culture.

#### **1.2. Obtention de la TK de *S. cerevisiae* sous forme d'extrait liquide brut**

Afin d'obtenir la TK de *S. cerevisiae* sous forme d'extrait cellulaire brut, 10 g de culot cellulaire de *S. cerevisiae* H402 (pTKL1) sont repris dans 100 mL de tampon Tris 0,1 M pH 7,5 contenant des inhibiteurs de protéases (benzamidine 1 mM ; leupeptine 15 µg.mL<sup>-1</sup> et pepstatine 3 µg.mL<sup>-1</sup>). La lyse cellulaire est effectuée à l'aide d'un désintegrateur de cellules réglé à une pression de 2 kBar. Les débris cellulaires sont éliminés après trois centrifugations successives : 3 000 et 11000 g pendant 15 minutes et 25 000 g pendant 20 minutes. Le surnageant contenant la TK (1 U.mg<sup>-1</sup>) est aliquoté en eppendorf (1mL) et conservé à – 20 °C.

### **2. Production de FSA mutée A129S :**

Le gène de la FSA mutée A129S a été sous cloné dans un plasmide de type *Ptac/lacI* modifié par ajout d'une cassette de résistance à la kanamycine pour obtenir le plasmide pJF119fsaA129S-kan. Ce plasmide a été transformé dans une souche *E. coli* K-12 DH5α afin de pouvoir produire la FSA mutée A129S.

#### **2.1. Conditions de culture de la souche *E. coli*/pJF119fsaA129S-kan**

A partir d'une préculture de 100mL réalisée durant une nuit à 37 °C, 5 L de milieu LB sontensemencé en présence de kanamycine. La souche est cultivée à 37 °C jusqu'à ce que la DO atteigne une valeur de 0,5 à 0,8. L'induction est réalisée à 30 °C sur une période de 16 heures par ajout de 0,1 mM d'IPTG. Les cellules sont récupérées par centrifugation à 12000g pendant 30 minutes à 4 °C et conservées à – 80 °C. Le rendement de la culture est de 3 g de cellules (poids humide) par litre de culture.

## 2.2. Extraction et purification de la FSA A129S

Le culot cellulaire est décongelé et repris dans un minimum de tampon (GlyGly 50 mM, pH 8,5). Les cellules sont broyées par sonication. Après une centrifugation à 12000 g pendant 30 minutes à 4 °C, le surnageant est récupéré et chauffé à 75 °C pendant 40 minutes. Après une centrifugation à 12000 g pendant 30 minutes à 4 °C, le surnageant est récupéré et lyophilisé pour obtenir l'enzyme brute sous d'une poudre blanche que l'on stocke à 4 °C.

## 3. Etudes de croissance des souches auxotrophes

### 3.1. Etude de croissance en présence des différents intermédiaires

Les bactéries *E. coli* auxotrophes pour la leucine (G554) ou la méthionine (+2231) sont cultivées durant une nuit à 37 °C en milieu MS glucose (2 g.L<sup>-1</sup>) additionné de l'acide aminé nécessaire (0,3 mM). Les cellules sont ensuite rincées (par centrifugation douce et reprise dans du milieu MS) et diluées au 1/100<sup>ème</sup> en milieu MS glucose (culture témoin) et en MS glucose auquel est additionné le précurseur (aldéhyde  $\alpha$ -hydroxylé, acide  $\alpha$ -hydroxylé ou acide  $\alpha$ -cétonique) correspondant à l'acide aminé nécessaire à une concentration de 0,3 mM. Ces cultures sont effectuées en triple exemplaire. La croissance des cellules à 37 °C est suivie en continu par absorbance à 600 nm dans un appareil Bioscreen C (Thermofisher).

### 3.2. Etude de croissance en présence des sondes 3 et 4

Les différentes souches testées ont été cultivées durant 12 à 24 h à 37 °C en milieu MS glucose (2g.L<sup>-1</sup>) ARO shi B6 avec leucine ou méthionine et l'antibiotique correspondant à la résistance apportée par le plasmide.

Les cellules sont ensuite rincées (par centrifugation douce et reprise dans du milieu MS) et diluées au 1/100<sup>ème</sup> dans un milieu de culture identique à celui utilisé pour la préculture, excepté pour la source d'acide aminé. Pour chaque souche, trois cultures sont effectuées en l'absence d'acide aminé (témoin), en présence d'acide aminé (0,3 mM) ou en présence de la sonde **3** ou **4** (3 mM). La croissance des cellules est suivie par absorbance à 600 nm dans un appareil Bioscreen C (Thermofisher).

## 4. Méthodes de transformation

Deux techniques de transformation ont été utilisées. La technique est choisie en fonction de l'efficacité de transformation requise pour les différentes manipulations.

#### 4.1. Transformation par « choc thermique »

Cette technique a été utilisée pour la transformation de plasmides définis et purifiés. A partir d'une préculture (une nuit sous agitation à 37 °C), 25 mL de milieu LB sontensemencés au 1/50<sup>ème</sup> et incubés à 37 °C. Quand l' $A_{600}$  atteint une valeur de 0,6 à 0,7 , la culture est refroidie dans la glace puis centrifugée (5000 rpm ; 8 min ; 4 °C). Le culot est repris doucement avec 12,5 mL de  $\text{CaCl}_2$  0,1 M (stérile, stocké à 4 °C) et replacé dans la glace pendant 30 à 45 min. Après une seconde centrifugation (5000 rpm ; 8 min; 4 °C), le culot est repris avec 250  $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2$  0,1 M. Les cellules sont utilisées extemporanément.

Pour chaque transformation, 1  $\mu\text{L}$  (environ 0,5  $\mu\text{g}$  d'ADN) de solution du plasmide (*Miniprep Qiagen*) sont ajoutés à 40  $\mu\text{L}$  de suspension cellulaire, puis les cellules sont placées dans la glace pendant 30 à 45 minutes. Les cellules sont soumises ensuite à un choc thermique en étant placées à 37 °C pendant 5 min. puis replacées dans la glace. Les cellules sont reprises dans 1 mL de milieu LB et incubées à 37 °C pendant 30 min. à 1 heure pour laisser un temps suffisant pour l'expression du gène de résistance à l'antibiotique de sélection. Les cellules sont ensuite centrifugées, reprises avec 100  $\mu\text{L}$  de milieu LB et étalées en cadran sur milieu gélosé LB en présence d'antibiotique. Les boîtes de culture sont placées à 37 °C pour la nuit.

#### 4.2. Transformation par électroporation

Cette technique a été utilisée pour la transformation des produits de ligation. A partir d'une préculture (une nuit sous agitation à 37 °C), 200 mL de milieu LB sontensemencés au 1/100<sup>ème</sup> et la culture est incubée à 37 °C. Une fois que l' $A_{600}$  a atteint une valeur de 0,7 à 0,8 , la culture est placée dans la glace. Les cellules sont ensuite centrifugées (5000 rpm ; 8 min ; 4 °C). Successivement, les culots sont repris doucement avec 200 mL, 100 mL, 20 mL d'eau stérile osmosée (stocké à 4 °C) et enfin avec 2 mL d'une solution glacée de glycérol à 20 % (les cellules sont centrifugées entre chaque reprise). Les cellules ainsi préparées peuvent être utilisées fraîchement préparées (dans le cas d'une transformation d'une banque) ou bien congelées à - 80 °C en 15 % glycérol.

Pour chaque transformation, 1  $\mu\text{L}$  (environ 0,5  $\mu\text{g}$  d'ADN) de produit de ligation (MiniElute Qiagen) est ajouté à 50  $\mu\text{L}$  de suspension cellulaire dans une cuve d'électroporation. Les cellules sont soumises à un champ électrique pendant un temps bref (quelques ms) dans un électroporateur. Les cellules sont immédiatement reprises dans 1 mL de milieu LB et incubées à 37 °C pendant 30 min à 1 heure (en fonction de l'antibiotique). 100  $\mu\text{L}$  de culture sont ensuite étalés sur milieu gélosé LB en présence d'antibiotique. Les boîtes de culture sont placées à 37 °C pour la nuit.



## **5. Préparation d'ADN plasmidique**

### **5.1. Préparation à petite échelle**

Le plasmide est extrait d'un culot bactérien provenant d'une culture de 2,5 mL à saturation en utilisant le kit de purification *Miniprep (Qiagen)*. Le principe de ce kit est basé sur une lyse alcaline des bactéries suivie d'une neutralisation puis d'une purification des plasmides sur mini-colonne de silice. Ce protocole permet de purifier 5 à 20 µg d'ADN plasmidique. Il est utilisé pour la caractérisation des constructions de clonage et la conservation des plasmides validés dans la collection du Laboratoire.

### **5.2. Préparation à grande échelle**

Le plasmide est extrait d'un culot bactérien provenant de 100 à 200 mL de culture à une  $A_{600}$  de 0,4 en utilisant le kit *NucleoBond (Xtra Midi Plus)*. Ce protocole permet de purifier 150 à 500 µg d'ADN plasmidique. Il est utilisé pour obtenir la quantité d'ADN plasmidique requise pour le clonage d'une banque.

## **6. Dosage de l'ADN**

Le dosage des différentes préparations d'ADN est effectué par mesure du spectre d'absorbance entre 200 et 350 nm. Ces dosages sont réalisés en microcuve sur un volume de 50 µL. La DO du pic présent entre 250 et 260 nm permet d'obtenir la concentration en ADN sachant qu'une unité de DO correspond à 50 µg.L<sup>-1</sup> d'ADN.

## **7. Digestions plasmidiques**

Toutes les digestions enzymatiques ont été réalisées en utilisant des enzymes et des solutions tampon de marque *BioLabs*. Pour un volume final 50 µL, à 10 µL (environ 5 µg d'ADN) de plasmide (obtenu par *Miniprep Qiagen*) sont ajoutés 5 µL de tampon 10X ; 5 µL de BSA 10X (1 mg.mL<sup>-1</sup>) ; 1 à 2 µL d'enzyme de restriction et de l'eau osmosée. Après mélange au moyen d'un vortex, la préparation est incubée à 37 °C pendant 2h30. La qualité de la digestion est contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 % en présence de BET. La purification des ADN digérés est effectuée en utilisant un kit de purification *Qiagen (Qiaquick PCR purification kit)*.

## **8. Ligations**

Les réactions de ligation sont réalisées en utilisant le *Quick Ligation Kit (BioLabs)*. L'enzyme Quick T4 DNA ligase permet de ligaturer entre eux des fragments d'ADN linéaires.

Pour le clonage d'un fragment d'ADN dans un vecteur de clonage ou dans un vecteur d'expression, un ratio entre vecteur et insert de 1/5 est recommandé pour assurer un bon rendement d'insertion et limiter la ligation du vecteur sur lui-même. Dans un volume final de réaction de 20 µl, le vecteur et l'insert digérés sont mélangés en présence de 10 µL de tampon 2X et 1 µL de Quick T4 DNA Ligase. Après mélange au moyen d'un vortex, la préparation est incubée à température ambiante pendant 5 minutes. La réaction est arrêtée en plaçant le tube dans la glace. Les produits de ligation sont purifiés avant transformation avec le kit *Qiagen Minelute (Reaction Clean-Up)*.

## 9. Amplification par Réactions de polymérisation en chaîne (PCR)

Les cassettes de résistance au chloramphénicol (Cm<sup>R</sup>) et à la kanamycine (Kan<sup>R</sup>) ont été amplifiées par PCR en utilisant les amorces suivantes :

Cassette Cm <sup>R</sup> (XhoI-XbaI)	Fwd (Xho I)	5'- TCCGCTCGAGTCATCGCAGTACTGTTGTATTCATTAAGC
	Rev (XbaI)	5'- CTAGTCTAGAATGGGAATTAGCCATGGTCC
Cassette Kan <sup>R</sup> (XhoI-XbaI)	Fwd (Xho I)	5'- TCCGCTCGAGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
	Rev (XbaI)	5'- CTAGTCTAGAATGGGAATTAGCCATGGTCC

Pour amplifier les différentes cassettes de résistance, nous avons utilisé comme matrice les plasmides suivants :

- résistance au chloramphénicol : pKD4
- résistance à la kanamycine : pKD3

Ces réactions PCR sont réalisées en utilisant un kit Dynazyme. Pour un volume final de 50 µL, sont introduits dans un tube PCR 5 µL de tampon 10X, 4 µL de dNTP mix, 1 µL de chaque amorce, 0,5 µL de matrice (Miniprep), 0,5 µL de polymérase et de l'eau osmosée. Le tube est en suite placé dans un thermocycleur en utilisant le programme suivant :

- 5 min à 96 °C
- 30 cycles : 30 sec à 96 °C ; 30 sec à 55 °C ; 1 min à 72 °C
- 5 min à 72 °C

La taille du produit de PCR est contrôlée par électrophorèse dans un gel d'agarose 0,8 % en présence de BET et le fragment amplifié est purifié à l'aide du kit *Qiaquick PCR Purification Kit*.

## 10. Préparation des banques de TK mutées (Fenêtre XhoI-XbaI)

Pour ces expériences, nous avons tout d'abord insérés des cassettes de résistance à la place des séquences destinées à être modifiées par « cassette mutagenesis ». Ces constructions plasmidiques ont été vérifiées par séquençage.

Le plasmide (avec une cassette CAT insérée dans la fenêtre XhoI – XbaI) a tout d'abord été purifié grâce à un kit *MidiPrep Nucleobond*. Le plasmide a ensuite été digéré par XhoI et XbaI (4 µg de plasmide et 5 µL de chaque enzyme dans un volume de 200 µL) et purifié sur gel d'agarose 0,8 % (sans BET). Après migration, le gel est découpé de façon à récupérer et purifier le vecteur digéré au moyen d'un kit *Qiaquick (Gel Extraction Kit)*.

Les inserts ont été synthétisés par MWG. La préparation des inserts dégénérés a été réalisée par PCR en utilisant les amorces et les matrices suivantes (enzyme Taq Polymérase *Takara* et 10 cycles : 30 sec à 94 °C ; 1 min à 55 °C ; 45 sec à 72 °C).

Matrice Leu 383	5'- TTGCCAGAGTTGATTGGTGGTTCTGCCGATCTGACACCTTCTAACTTGACCAGATGGAAGGAAG
Matrice Glu 383	5'- TTGCCAGAGTTGATTGGTGGTTCTGCCGATGAAACACCTTCTAACTTGACCAGATGGAAGGAAG
Amorce fwd	5'- ATCCGCTCGAGGATGTTTACAATCAATTGCCAGAGTTG
Amorce rev	5'- ACTAGTCTAGAGCTTCCTTCCATC

La séquence surlignée de la matrice a été dégénérée lors de sa synthèse. En effet, celle-ci a été synthétisée avec 5 % de chaque autre base (15 % d'erreur théorique). Les amorces possèdent les sites de restriction XhoI et XbaI. Après amplification PCR, l'insert est purifié puis digéré par XbaI et XhoI (purifié par kit *Qiagen MinElute* et contrôlé sur gel d'agarose 2 %).

Avant ligation, le vecteur et l'insert sont dosés par mesure de la DO à 250 nm. La ligation est réalisée par la Quick Ligase T4 en utilisant 3nM de vecteur et 20 nM d'insert. Après ligation, les produits de ligation sont purifiés par *Qiaquick PCR Purification Kit*.

Les deux banques vecteurs avec les inserts dégénérés dans le gène TKL1 sont transformées par électroporation dans une souche de clonage et les transformants ont été sélectionnés sur LB Amp (plasmide de type pUC 18) afin d'analyser la qualité de la banque. Une transformation a également été réalisée dans deux souches dépourvues des gènes de TK et les transformants ont été sélectionnés sur MS Glc Amp (sélection des clones exprimant une TK fonctionnelle). Les transformations des banques de TK sont réalisées en utilisant des cellules électrocompétentes fraîchement préparées.

## **11. Banque de mutants d'insertion de la souche G1146**

### **11.1. Création de la banque de mutants**

Des cellules G1146 électrocompétentes ont été préparées selon le protocole décrit précédemment. La transformation des cellules G1146 a été effectuée par électroporation avec le transposome EZ-Tn5™ <KAN-2>Tnp selon les indications du fabricant (Epicentre). Les bactéries recombinantes (dans le chromosome desquelles un transposon s'est aléatoirement inséré) ont été sélectionnées sur milieu semi-solide LB kanamycine. Les colonies résistantes à la kanamycine ont ensuite été repiquées en milieu LB en présence de kanamycine et de glycérol à 10 %. Cette étape de repiquage a été effectuée en plaque 384 puits au moyen d'un robot « colony picker » (Q-Bot, Genetix) et nous a permis d'obtenir 10752 clones indépendants, soit 28 plaques de 384 puits. Après 48 heures de culture à 37 °C, ces 10752 clones, qui constituent une banque de transposons, ont été congelés à – 80 °C pour conservation.

### **11.2. Criblage de la banque**

#### **11.2.1. Etape d'adaptation**

Les plaques 384 puits de la banque en milieu LB Kan Glycérol 10 % ont été décongelées sous hotte à flux laminaire. Durant cette étape de décongélation, les couvercles des plaques ont été retirés afin d'éviter des contaminations éventuelles entre puits provoquées par un phénomène de condensation.

Les puits des plaques 384 puits utilisées pour l'étape d'adaptation ont été remplis à l'aide d'un robot (60 µL de milieu par puit) avec le milieu MS Glucose Aro Shi B6 Kan Méthionine préparé sous hotte à flux laminaire et stérilisé par filtration (unité de filtration Nalgene MF75 0,22 µm). L'opération de réplication (3 à 4 ensemencements successifs) a été réalisé à l'aide de répliqueurs 384 aiguilles stériles à usage unique (Q-Rep, Genetix). Les plaques ont été enveloppées dans du film étirable Saran pour éviter leur dessiccation par évaporation avant d'être placées en étuve à 37 °C pendant 72 heures. Le suivi de croissance a été effectué par lecture de l'absorbance à 600 nm au moyen d'un lecteur de microplaque (Spectramax) toutes les 24 heures.

#### **11.2.2. Etape de criblage de la banque**

Les plaques 384 puits utilisées pour l'étape de criblage ont été remplies à l'aide d'un robot (60 µL de milieu par puit) avec deux milieux différents : le milieu de criblage MS Glucose Aro Shi B6 Kan Sonde **4** 0,8 mM et le milieu témoin MS Glucose Aro Shi B6 Kan.

Ces deux milieux ont été préparés sous hotte à flux laminaire et stérilisés par filtration (Nalgene MF75 0,22 µm).

Le contenu des plaques 384 puits de l'étape d'adaptation a été homogénéisé par pipetage au moyen d'une pipette multicanaux équipé de cônes stériles (200 µL). L'ensemencement des plaques 384 puits (criblage et témoin) a été réalisé par transfert de 4 µL du contenu des puits des plaques d'adaptation au moyen d'une pipette multi-canaux équipée de cônes stériles (10 µL). Après ensemencement, les plaques ont été enveloppées dans du film étirable Saran avant d'être placées en étuve à 37 °C pendant 72 heures. Le suivi de croissance a été effectué par lecture de l'absorbance à 600 nm au moyen d'un lecteur de microplaque (Spectramax) toutes les 24 heures.

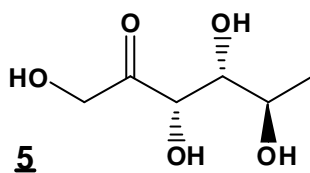
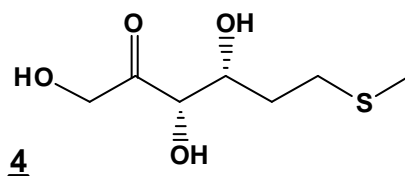
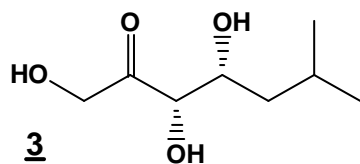
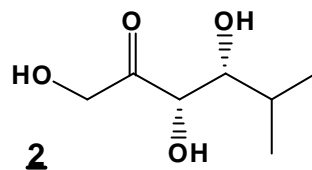
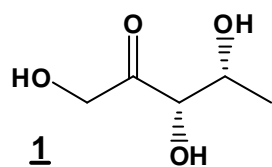
## **12. Séquencage**

La validation des constructions réalisées en biologie moléculaire a été effectuée d'après les séquences fournies par la plateforme de séquençage du Genoscope (Evry). Le séquençage des plasmides a été réalisé (après amplification en présence d'amorces appropriées) soit à partir de plasmides purifiés par Midiprep, soit à partir de cultures cellulaires (amplification réalisée par « rolling circle amplification » (RCA)).

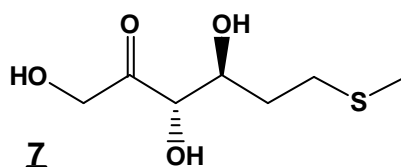
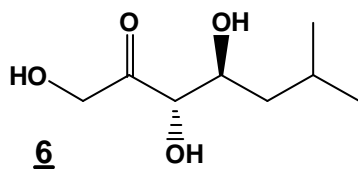
## **Annexes**



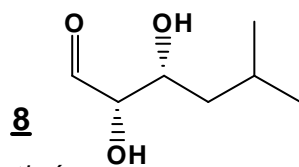
# Annexe 1 : Structures des sondes



Cétoses D-thréo



Cétoses L-érythro



Aldoses D-thréo



**Annexe 2 : Code Génétique et Nomenclature des acides aminés**

		Deuxième lettre									
		U		C		A				G	
Première lettre	U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U	Troisième lettre
		UUC		UCC		UAC		UGC		C	
		UUA	Leu	UCA		Stop	UAA	UGA		A	
		UUG		UCG			UAG	UGG		G	
	C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U	
		CUC		CCC		CAC		CGC		C	
		CUA		CCA		CAA		CGA		A	
		CUG		CCG		CAG		CGG		G	
	A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U	
		AUC		ACC		AAC		AGC		C	
		AUA		ACA		AAA	AGA	A			
		AUG		Met		ACG	AAG	Arg		G	
	G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	U	
		GUC		GCC		GAC		GGC		C	
		GUA		GCA		GAA	GGA	A			
		GUG		GCG		GAG	GGG	G			

Nom complet	Code à une lettre	Code à trois lettres
Alanine	A	Ala
Arginine	R	Arg
Asparagine	N	Asn
Acide aspartique	D	Asp
Cystéine	C	Cys
Acide glutamique	E	Glu
Glutamine	Q	Gln
Glycine	G	Gly
Histidine	H	His
Isoleucine	I	Ile
Leucine	L	Leu
Lysine	K	Lys
Méthionine	M	Met
Phénylalanine	F	Phe
Proline	P	Pro
Sérine	S	Ser
Thréonine	T	Thr
Tryptophane	W	Trp
Tyrosine	Y	Tyr
Valine	V	Val

### Annexe 3 : Plasmides et Souches

Nom du plasmide	Type de plasmide	Gène cloné
pSP100	pUC	-
pDRI5	pUC	TKL1
pVDM18	pSU	-
pGEN377	pSU	TKL1

Nom de la souche	Génotype	Plasmide
+2231	$\Delta metA$	-
G91	$\Delta tktA \Delta tktB$	-
G391	$\Delta tktA \Delta tktB$	pDRI5
G554	$\Delta leuABCD$	-
G678	$\Delta tktA \Delta tktB \Delta leuABCD$	-
G1073	$\Delta tktA \Delta tktB \Delta leuABCD$	pSP100
G1074	$\Delta tktA \Delta tktB \Delta leuABCD$	pDRI5
G1146	$\Delta tktA \Delta tktB \Delta metA$	-
G1241	$\Delta tktA \Delta tktB \Delta metA$	pSP100
G1242	$\Delta tktA \Delta tktB \Delta metA$	pDRI5
G1979	$\Delta tktA \Delta tktB \Delta leuABCD$	pVDM18
G1980	$\Delta tktA \Delta tktB \Delta metA$	pVDM18
G1983	$\Delta tktA \Delta tktB \Delta leuABCD$	pGEN377
G1984	$\Delta tktA \Delta tktB \Delta metA$	pGEN377

#### Annexe 4 : Séquence TKL1 modifiée XhoI / XbaI

1081	tta tca gaa act gtt <u>ctC gag</u> gat gtt tac aat caa ttg cca gag	1125
361	Leu Ser Glu Thr Val Leu Glu Asp Val Tyr Asn Gln Leu Pro Glu	375
	<b>XhoI</b>	
1126	ttg att ggt ggt tct gcc gat tta aca cct tct aac ttg acc aga	1170
376	Leu Ile Gly Gly Ser Ala Asp Leu Thr Pro Ser Asn Leu Thr Arg	390
1171	tgg aag gaa <u>gcT ctA</u> gac ttc caa cct cct tct tcc ggt tca ggt	1215
391	Trp Lys Glu Ala Leu Asp Phe Gln Pro Pro Ser Ser Gly Ser Gly	405
	<b>XbaI</b>	

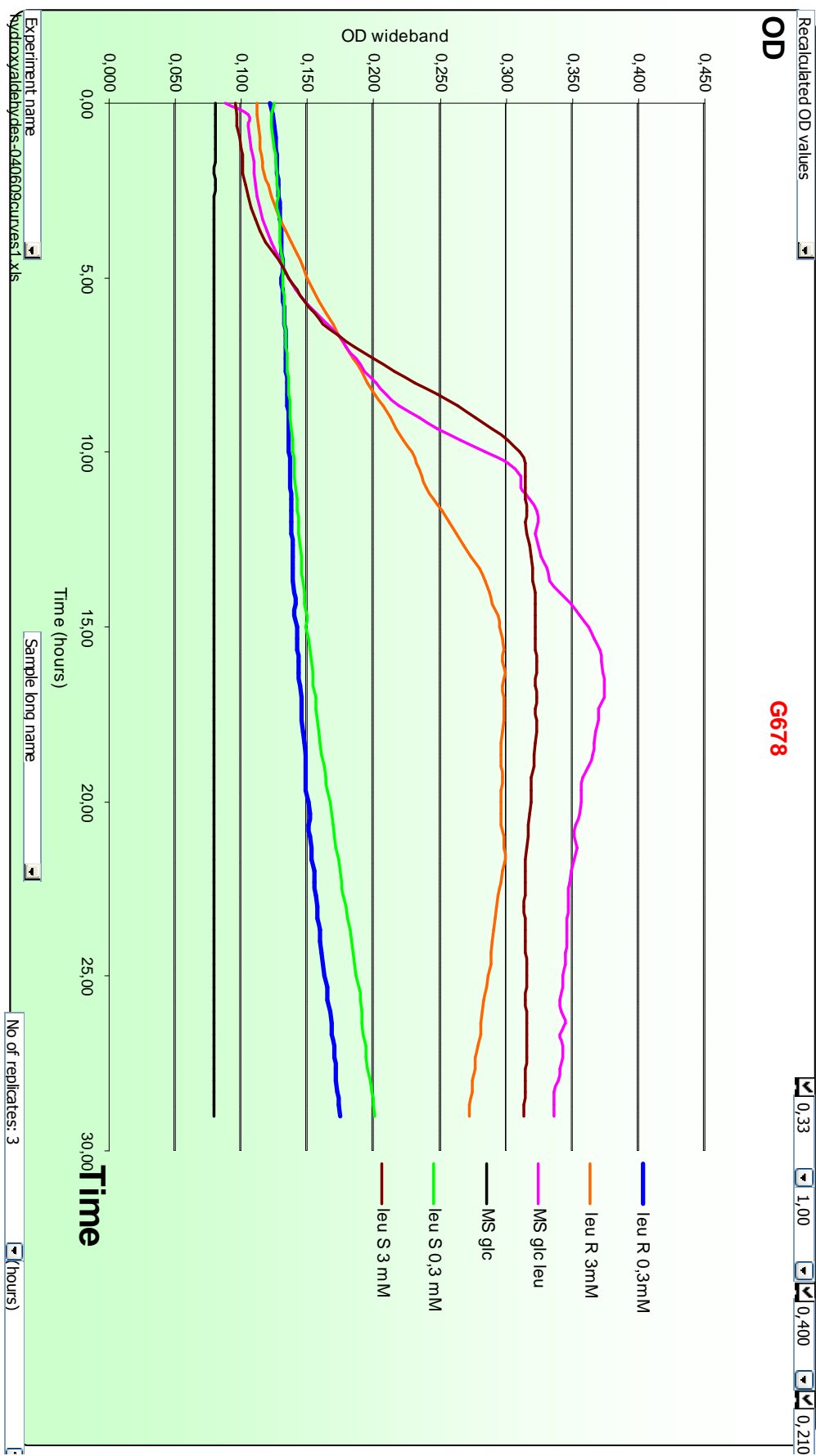
**Annexe 5 : Séquence des cassettes des clones de la banque Leu383  
sélectionnés sur milieu MS Glc Amp**

TKL1 (CTG)	I	G	G	S	A	D	L	T	P	S	N	L	T
Clone 1	F	G	G	S	A	D	L	T	P	S	T	L	T
Clone 2	I	G	G	S	A	D	L	T	T	S	N	L	T
Clone 3	I	A	G	S	A	D	L	T	T	S	N	L	T
Clone 4	I	G	G	S	A	D	V	T	P	S	N	L	T
Clone 5	I	G	G	S	A	D	L	R	P	S	N	V	T
Clone 6	I	G	G	S	T	D	L	T	T	S	S	F	T
Clone 7	M	G	G	S	A	D	L	T	A	S	N	L	S
Clone 8	I	G	G	S	A	D	L	T	P	S	N	M	T
Clone 9	I	G	G	S	A	D	L	T	P	S	N	L	S
Clone 10	F	G	G	S	A	D	L	T	P	S	N	L	T
Clone 11	I	V	G	S	A	D	L	T	P	S	I	F	T
Clone 12	I	G	G	S	G	D	L	T	V	S	N	L	T
Clone 13	I	G	A	S	A	D	L	T	A	S	N	L	T
Clone 14	F	G	G	S	S	D	L	T	H	S	N	L	T
Clone 15	I	G	G	S	S	D	L	T	P	S	N	L	T
Clone 16	I	G	G	S	A	D	L	S	L	S	N	L	T
Clone 17	I	G	G	S	A	D	L	T	P	S	T	L	A
Clone 18	I	C	G	S	A	D	L	T	H	S	N	L	T
Clone 19	I	G	G	S	A	D	L	T	N	S	N	L	T
Clone 20	I	G	G	S	A	D	I	T	S	S	N	L	T
Clone 21	I	G	G	S	A	D	L	T	P	S	N	L	T
Clone 22	I	G	G	S	A	D	L	T	P	S	N	L	T
Clone 23	V	G	G	S	A	D	L	T	L	S	N	W	T
Clone 24	I	G	G	S	A	D	L	T	P	S	N	L	A
Clone 25	I	A	G	S	A	D	L	T	P	S	N	L	T
Clone 26	I	G	G	S	A	D	L	A	P	S	N	L	T
Clone 27	I	G	G	S	A	D	L	T	P	A	N	L	A
Clone 28	L	G	G	S	T	D	L	T	P	S	T	L	T
Clone 29	I	G	G	S	A	D	L	S	P	S	N	L	T
Clone 30	M	G	G	A	A	D	L	T	H	S	S	L	T
Clone 31	V	G	G	S	S	D	L	T	P	S	T	L	T
Clone 32	I	G	G	S	A	D	L	T	T	S	N	L	T
Clone 33	F	G	G	S	S	D	L	T	T	S	N	L	S
Clone 34	F	S	G	S	A	D	L	T	T	S	C	L	T
Clone 35	I	G	G	S	A	D	L	T	P	S	N	L	T
Clone 36	I	G	G	S	A	D	L	T	T	S	N	L	T
Clone 37	I	G	G	S	A	D	L	T	T	S	N	L	T
Clone 38	I	G	G	S	A	D	L	S	T	S	N	L	T
Clone 39	I	A	G	S	A	D	L	T	P	S	N	L	T
Clone 40	V	G	G	S	A	D	L	T	P	S	N	L	C
Clone 41	I	V	G	S	A	D	L	T	P	S	N	L	T
Clone 42	I	G	G	S	A	D	L	T	H	S	N	M	T
Clone 43	F	G	G	S	A	D	L	T	P	S	N	F	T
Clone 44	I	G	G	S	A	D	V	T	S	S	N	L	T
Clone 45	I	G	G	S	A	D	L	S	R	S	N	L	T
Clone 46	I	G	G	S	A	D	L	T	P	S	N	L	T
Clone 47	I	G	G	S	G	D	L	T	A	S	N	L	T
Clone 48	V	G	G	S	A	D	L	T	P	P	N	M	T
Clone 49	V	G	G	S	A	D	L	T	P	P	N	M	T
Clone 50	I	G	G	S	A	D	L	T	P	S	N	F	T

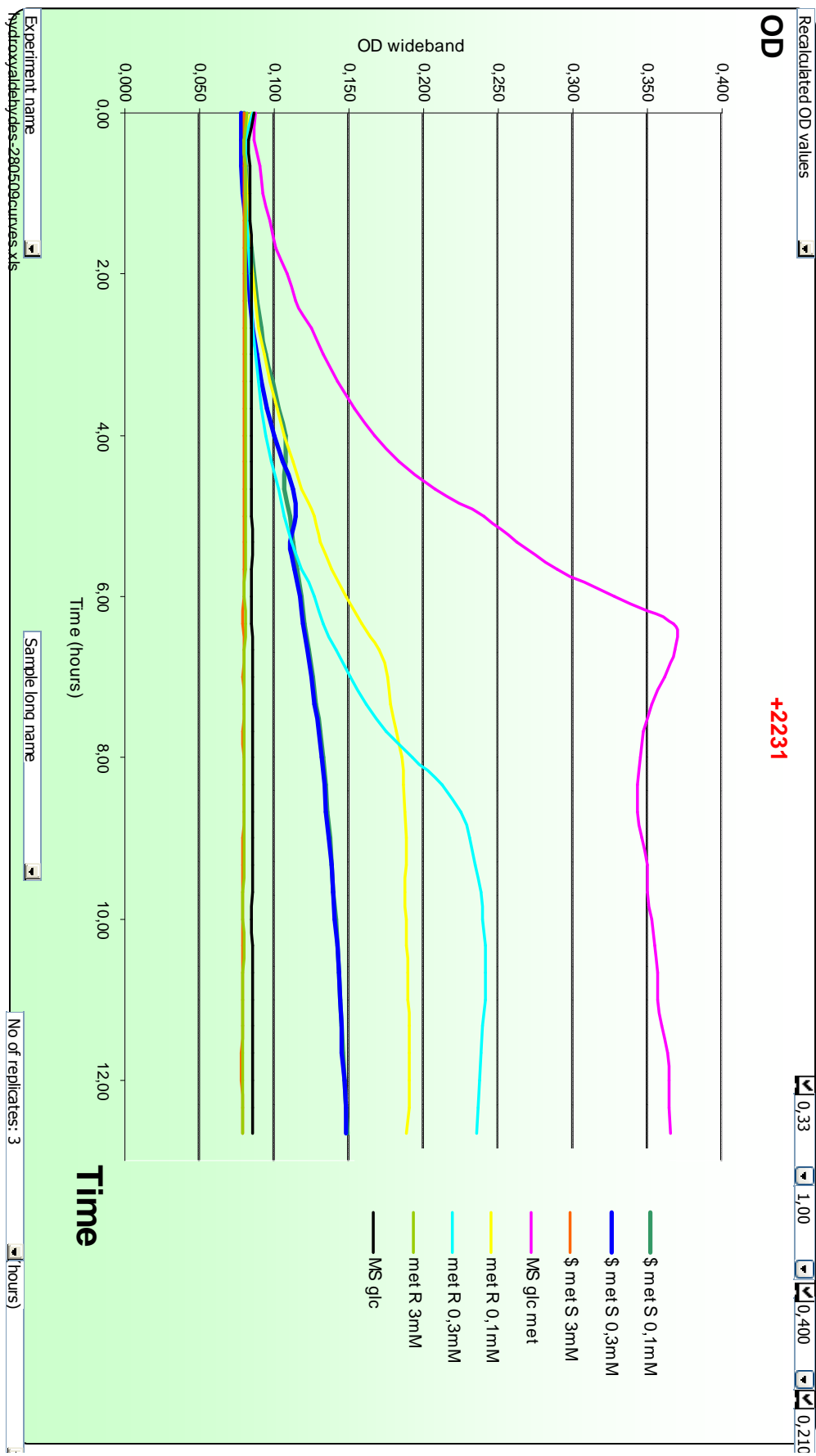
**Annexe 6 : Séquence des cassettes des clones de la banque Glu383  
sélectionnés sur milieu MS Glc Amp**

TKL1 (GAA)	I	G	G	S	A	D	E	T	P	S	N	L	T
Clone 1	I	G	G	F	A	D	V	T	P	T	T	L	S
Clone 2	I	G	G	S	A	D	Q	T	A	S	N	L	T
Clone 3	I	G	G	S	A	D	L	T	P	S	S	L	T
Clone 4	L	G	G	S	A	D	L	T	P	S	N	L	A
Clone 5	I	G	G	S	S	D	E	T	A	S	N	L	T
Clone 6	I	G	G	S	A	D	Q	T	P	S	N	L	T

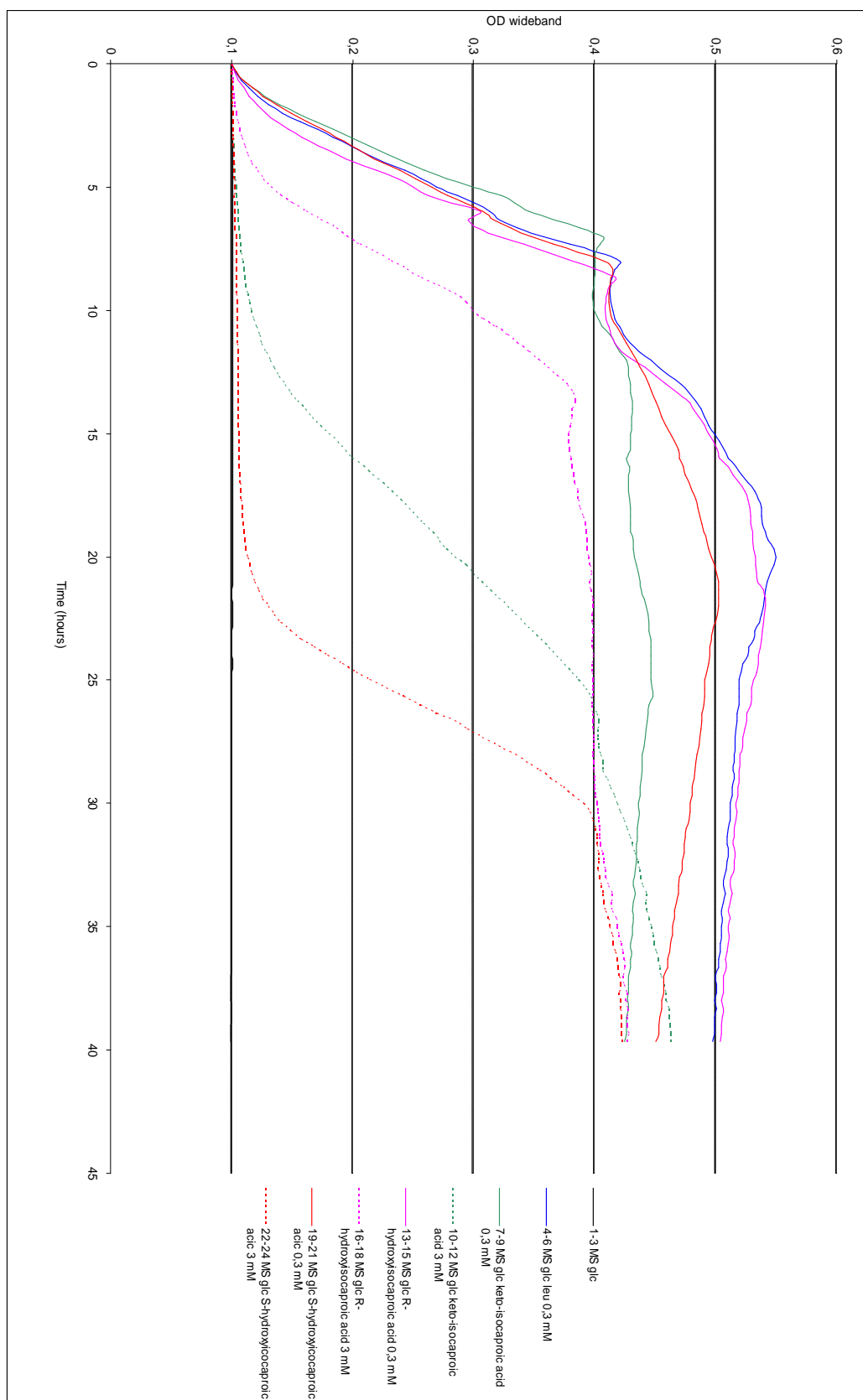
Annexe 7 : Etude de croissance de la souche G678 en présence des aldéhydes (R)-29 et (S)-29



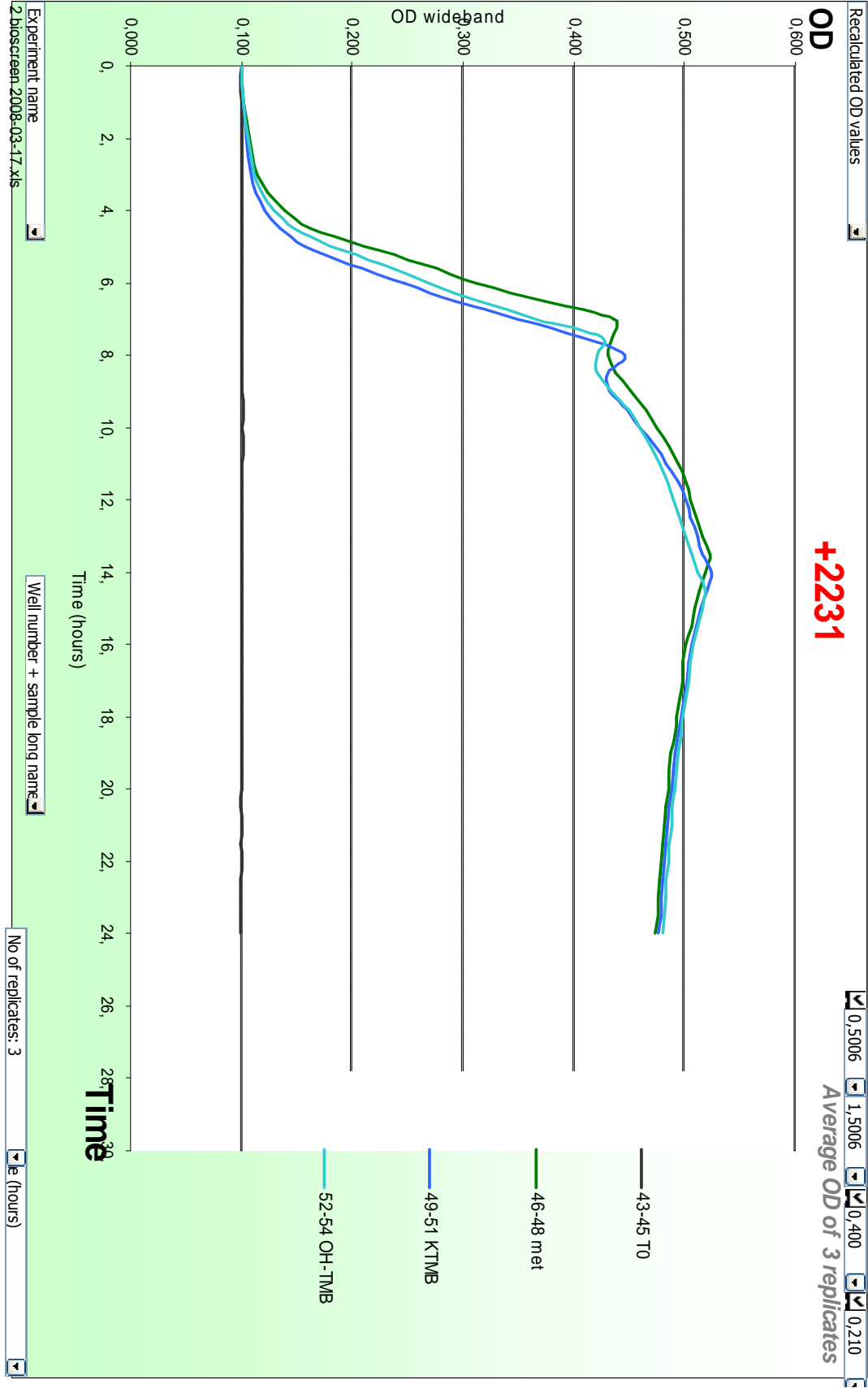
Annexe 8 : Etude de croissance de la souche +2231 en présence des aldéhydes(R)-34 et (S)-34



**Annexe 9 : Etude de croissance de la souche G678 en présence des intermédiaires hydroxyacides et cétoacides précurseurs de la leucine.**

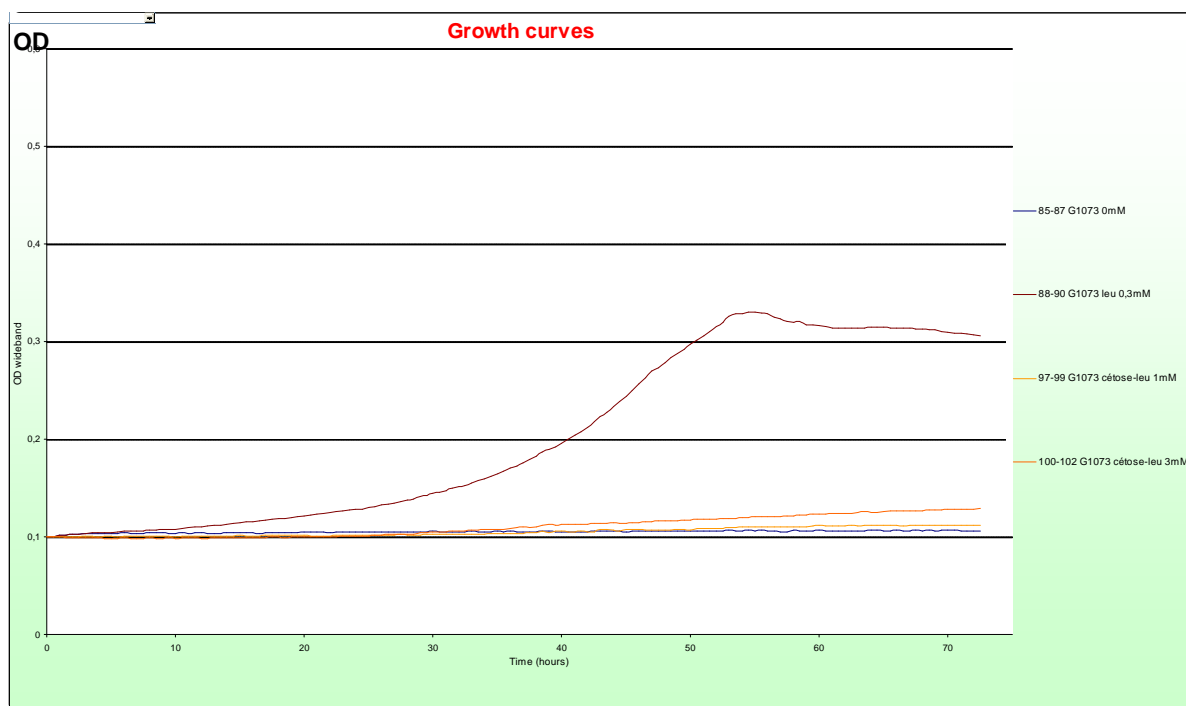
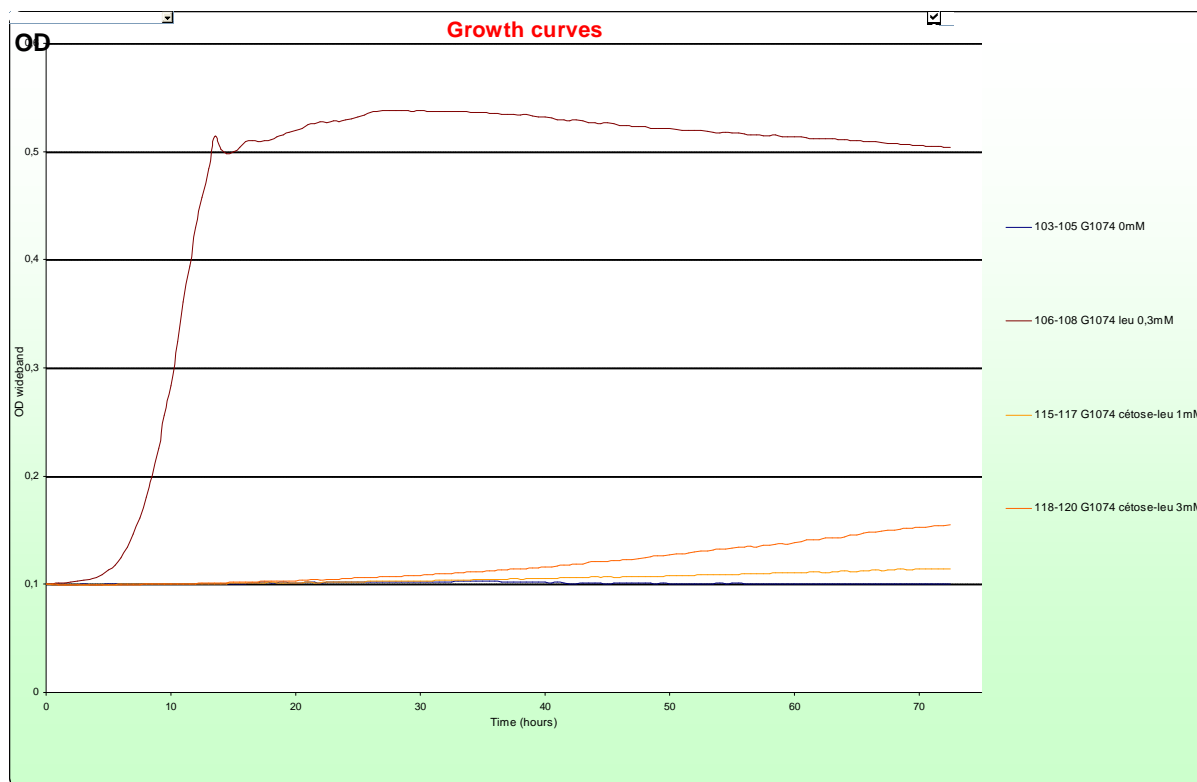


Annexe 10 : Etude de croissance de la souche +2231 en présence des intermédiaires (hydroxyacide KTMB et cétoacide OH-TMB à 0,3mM) précurseurs de la méthionine

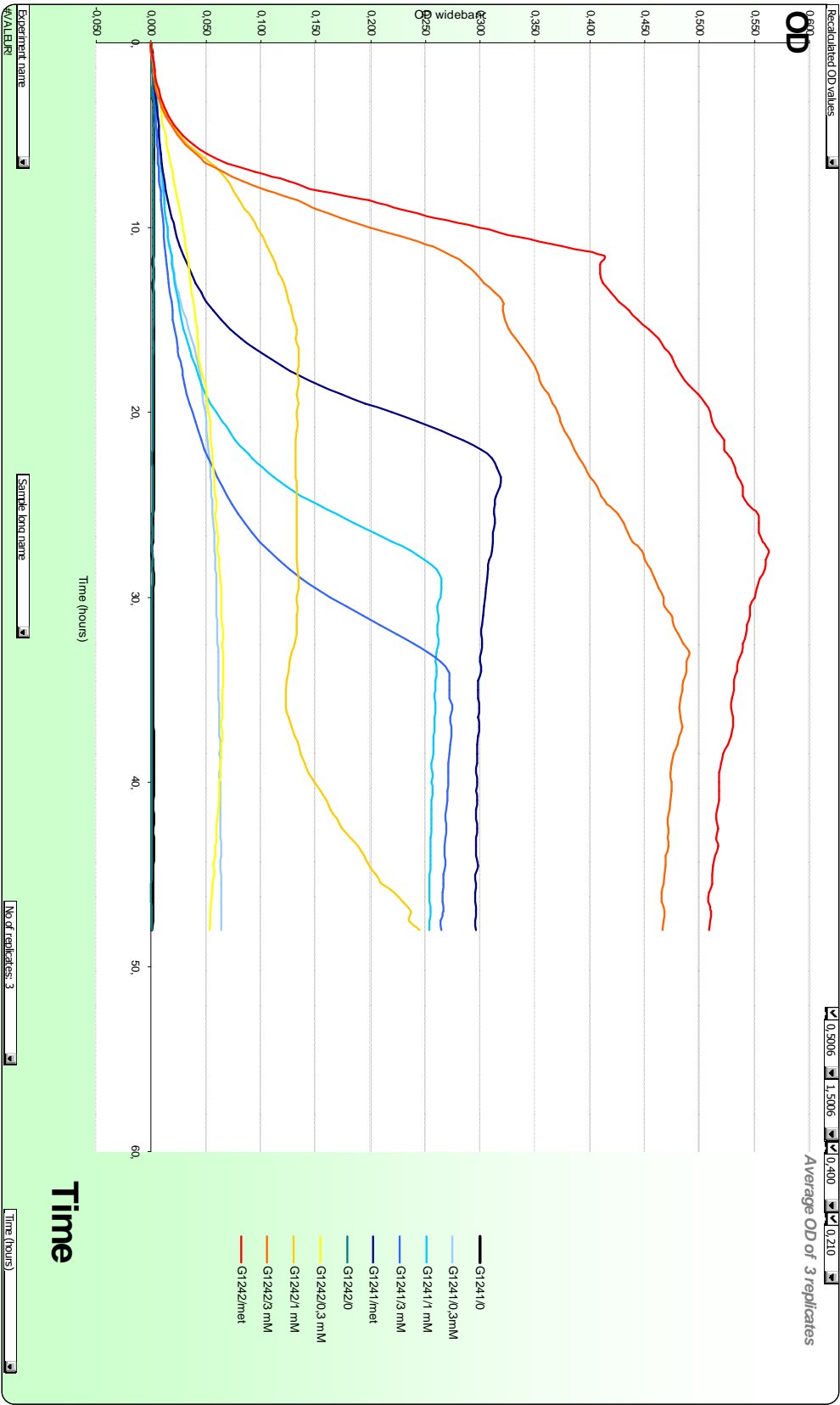




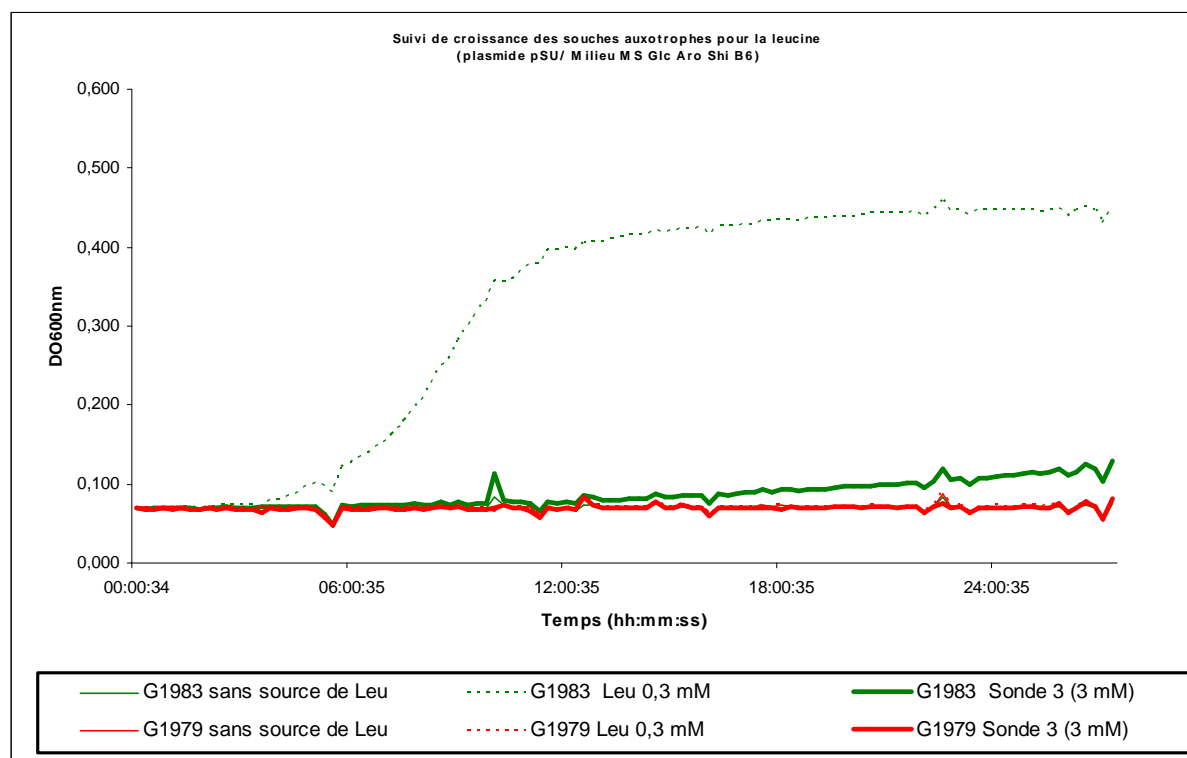
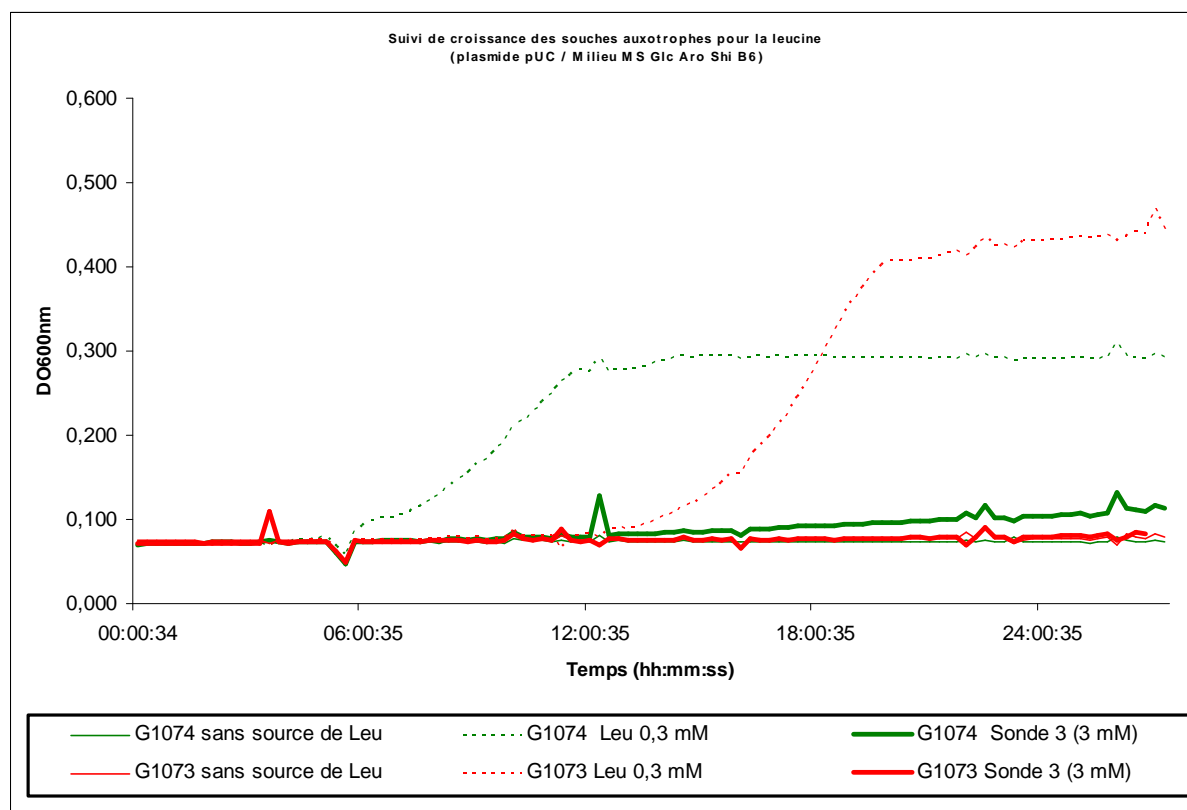
**Annexe 11 : Etude de croissance des souches auxotrophes pour la leucine  
en présence de différentes concentrations de la sonde 3**



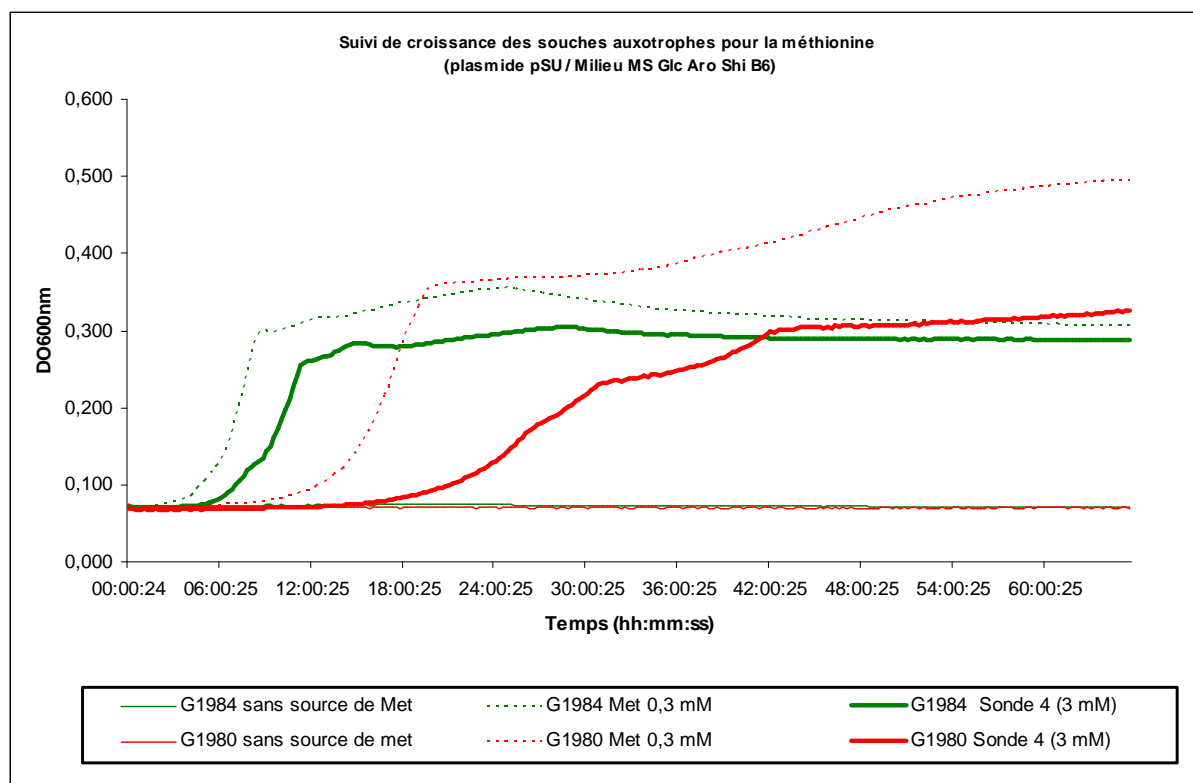
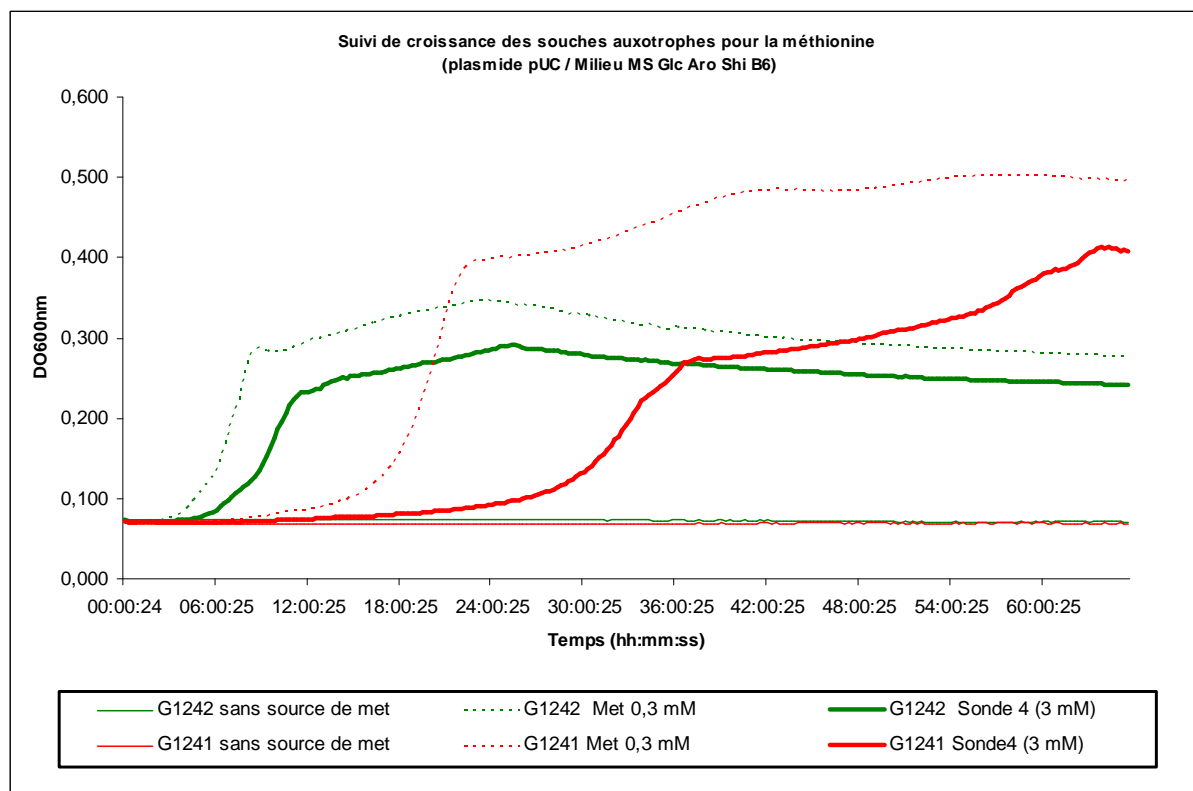
Annexe 12 : Etude de croissance des souches auxotrophes pour la méthionine en présence de différentes concentrations de la sonde 4.



### Annexe 13 : Etude de croissance des souches auxotrophes pour la leucine en présence de la sonde 3



# **Annexe 14 : Etude de croissance des souches auxotrophes pour la méthionine en présence de la sonde 4**





## **Références bibliographiques**



- 
- <sup>1</sup> Levin, G.V. *Journal of Medicinal Food* **2002**, 23-36.
- <sup>2</sup> Charmantray, F. ; Dellis, P. ; Hélaine, V. ; Samreth, S. ; Hecquet, L. *Eur. J. Org. Chem* **2006**, 24, 5526-5532.
- <sup>3</sup> Sevestre, A. ; Helaine, V. ; Guyot, G. ; Martin C. ; Hecquet, L. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 827-830.
- <sup>4</sup> Hélaine, V. ; Lasikova, A. ; Legeret, B. ; Hecquet, L. *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 3229-3233.
- <sup>5</sup> Chen, K. ; Arnold, F.H. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**, 90, (12), 5618-5622.
- <sup>6</sup> Stemmer, W. P. *Nature* **1994**, 370, (6488), 389-391.
- <sup>7</sup> Noir, M.E. ; Newcomb, T.G. ; Wilson, H.M.P. ; Loeb, L.A. *Proc. National. Acad. Sci USA* **1996**, 93, 3525-3529.
- <sup>8</sup> Stemmer, W.P.C. *Methods for in vitro recombination (US Patent)* **1997**, 5, 605-793.
- <sup>9</sup> Arnold, F.H. *Acct. Chem. Research* **1998**, 31, 125-131.
- <sup>10</sup> Arnold, F.H. *Nat. Biotechnol.* **1998**, 16, 617-618.
- <sup>11</sup> Arnold, F.H. *Chem. Eng. Sci.* **1996**, 51, 5091-5102.
- <sup>12</sup> Leung, D.W. ; Chen, E. ; Goeddel D. V. *Technique* **1989**, 1, 11-15.
- <sup>13</sup> Cadwell, R.C. ; Joyce, G.F. *PCR Methods and Applications* **1992**, 28-33.
- <sup>14</sup> Otten, L.G. ; Sio, C. F. ; Vrieling, J. ; Cool, R. H. ; Quax, W. J. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, (44), 42121-42127.
- <sup>15</sup> Shivange, A.V. ; Marienhagen, J. ; Mundhada, H. ; Schenk, A. ; Schwaneberg, U. *Current Opinion in Chemical Biology*, **2009**, 13, 19-25.
- <sup>16</sup> Wong, T.S. ; Roccatano, D. ; Schawaneberg, U. *Env. Microbiol.* **2007**, 9, 2645-2659.
- <sup>17</sup> Emon, S. ; Mondon, P. ; Pizzuit-Serin, S. ; Douchy, L. ; Crozet, F. ; Bouayadi, K. ; Kharrat, H. ; Potocki-Veronese G. ; Monsan P. ; Remaud-Simeon, M. *Protein Eng. Des. Sel* **2008**, 21, 267-274.
- <sup>18</sup> Kamiya, H. ; Ito, M. ; Harashima, H. ; *Biol. Pharm. Bull.* **2007**, 30, 842-844.
- <sup>19</sup> Wong, T.S. ; Roccatano, D. ; Zacharias, M. ; Schawaneberg, U. *J. Mol. Biol.* **2006**, 355, 858-871.
- <sup>20</sup> Higuchi, R. ; Krummel, B. ; Saiki, R.K. *Nucl. Acids Res.* **1988**, 16, (15), 7351-7367.
- <sup>21</sup> Ke, S. H. ; Madison, E. L. *Nucl. Acids Res.* **1997**, 25, (16), 3371-3372.
- <sup>22</sup> Bauer, J.C. ; Wright, D.A. ; Braman, J.C ; Geha, R.S. (Stratagen) U.S. Patent 5,789,166, **1998**.
- <sup>23</sup> Zheng, L. ; Baumann, U ; Reymond J. L. *Nucl. Acids Res.* **2004**, 32, (14) , e115.



- 
- <sup>24</sup> Edelheit, O. ; Hanukoglu, A ; Hanukoglu, I *BMC Biotech.* **2009**, 9, (61).
- <sup>25</sup> Kirsh R.D. ; Joly, E. *Nucl. Acids Res.* **1998**, 26, (7), 1848-1850.
- <sup>26</sup> Hutchison, C.A. ; Nordeen, S.K. ; Vogt, K. ; Edgell M.H. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1986**, 83, 710-714.
- <sup>27</sup> Reetz, M.T. ; Bocola, M. ; Carballeira, J.D. ; Zha, D. ; Vogel, A. *Angew. Chem Int. Ed.* **2005**, 44, 4192-4196.
- <sup>28</sup> Reetz, M.T., Wang, L. W. Bocola, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 1236-1241.
- <sup>29</sup> Reetz, M.T. ; Kahakeaw, D. ; Sanchis, J. *Mol. Biosyst.* **2009**, 5, 115-122.
- <sup>30</sup> Reetz, M. T. ; Wu, S. *Chem. Commun.* **2008**, 43, 5499-5501.
- <sup>31</sup> Short, J.M. (Diversa Corporation). U.S. Patent 6,171,820, **2001**.
- <sup>32</sup> DeSantis, G. ; Wong K. ; Farwell, B. ; Chatman, K. ; Zhu, Zoulin ; Tomlinson, G ; Huang, H. ; Tan, X. ; Bibbs, L. ; Chen, P. ; Kretz, K. ; Burk, M.J. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 11476-11477.
- <sup>33</sup> Kretz, K.A. ; Richardson, T.H. ; Gray, K.A. ; Robertson, D.E. ; Tan, X. ; Short, J.M. *Methods in Enzymology*, **2004**, 388, 3-11.
- <sup>34</sup> Taylor, S.V. ; Kast, P. ; Hilvert, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 3310-3335.
- <sup>35</sup> Fong, S. ; Machajewski, T.D. ; Mak, C.C. ; Wong, C.H. *Chem. Biol.* **2000**, 7, (11), 873-883.
- <sup>36</sup> Dean, K.E.S. ; Klein, G. ; Renaudet, O. ; Reymond, J.L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 1653-1656.
- <sup>37</sup> Konarzycka-Bessler, M. ; Bornschuer, U.T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, (12), 1418-1420.
- <sup>38</sup> Mayer, K.M. ; Arnold, F.H. *J. Biomol. Screen.* **2002**, 7, 135-140.
- <sup>39</sup> Badalassi, F. ; Wahler, D. ; Klein, G. ; Crotti, P. ; Reymond, J.L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, (22), 4067-4070.
- <sup>40</sup> Klein, G. ; Reymond, J.L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, (9), 1113-1116.
- <sup>41</sup> Reetz, M.T. ; Zonta, A. ; Schimossek, K. ; Liebeton, K. ; Jaeger, K.E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, 36, 2830-2832.
- <sup>42</sup> Reetz, M.T ; Eipper, A. ; Tielmann, P. ; Mynott, R. *Adv. Synth. Cal.* **2002**, 344, (9), 1008-1016.
- <sup>43</sup> Sugiyama, M. ; Hong, Z. ; Greenberg, W.A. ; Wong, C.H. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, 15, 5905-5911.
- <sup>44</sup> Boersma, Y.L. ; Dröge, M.J. ; van der Sloot, A. M. ; Pijning, T. ; Cool, R.H. ; Dijkstra, B.W. ; Quax, W.J. *Chem. Biochem* **2008**, 9, 1110-1115.

- 
- <sup>45</sup> Lee, S.J., Kang, H.Y. ; Lee, Y. *J. Mol. Cat. B: Enz.* **2003**, 26, 265-272.
- <sup>46</sup> Reetz, M.T. ; Höbenreich, H. ; Soni, P. ; Fernández, L. *Chem. Commun.* **2008**, 5502-5504.
- <sup>47</sup> Liu, J.O. ; Licitra, E.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 12817-12821.
- <sup>48</sup> Baker, K. ; Blezinski, C. ; Lin, H. ; Salazar-Jimenez, G. ; Sengupta, D. ; Krane, S. ; Cornish, V.W. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, 99, (26), 16537-16542.
- <sup>49</sup> Lin, H. ; Tao, H. ; Cornish, V.W. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, (46), 15051-15059.
- <sup>50</sup> Peralta-Yahya, P. ; Carter, B.T. ; Lin, H. ; Tao, H. Cornish, V.W. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 17446-17452.
- <sup>51</sup> Morley, K.L. ; Kazlauskas, R.J. *Trends biotechnology* **2005**, 23, 231-237.
- <sup>52</sup> Chen-Goodspeed M. ; Sogrob, M.A. ; Wu, F. ; Raushel, F.M. *Biochemistry* **2001**, 40, (5), 1332-1339.
- <sup>53</sup> Jennewein, S. ; Shürmann, M. ; Wolberg, M. ; Hilker, I. ; Luiten, R. ; Wubbolts, M. Mink, D. *Biotechnol. J.* **2006**, 1, 537-548.
- <sup>54</sup> Suenaga, H. ; Watanabe, T. ; Sato, M. ; Furukawa, K. *J. Bacteriol.* **2002**, 184, (13), 3682-3688.
- <sup>55</sup> Otten, L.G. ; Sio, C.F. ; Vrieling, J. ; Cool, R.H. ; Quax, W.J. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, (44), 42121-42127.
- <sup>56</sup> McCool, B.A. ; Plonk, S.G. ; Martin, P.R. ; Singleton, C.K. *J Biol Chem* **1993**, 268, (2), 1397-1404.
- <sup>57</sup> Zhao, J. ; Zhong, C.J. *Neurosci. Bull.* **2009**, 25, (2), 94-99.
- <sup>58</sup> Cascante, M. ; Centelles, J.J. ; Veech, R.L. ; Lee, W.N. ; Boros, L.G. *Nutr. Cancer* **2000**, 36, 150-154.
- <sup>59</sup> Comin-Anduix, B. ; Boren, J. ; Martinez, S. ; Moro, C. ; Centelles, J.J. ; Trebukhina, R. ; Petushock, N. ; Lee, W. N. ; Boros, L.G. ; Cascante, M. *Eur. J. Biochem.* **2001**, 268, 4177-4182.
- <sup>60</sup> Thomas, A.A. ; de Meese J. ; Le Huerou, Y. ; Boyd, S.A. ; Romoff, T.T. ; Gonzales, S.S. ; Gunawardana, I. ; Kaplan, T. ; Sullivan, F. ; Condroski, K. ; Lyssikatos, J. P. ; Aicher, T.D. ; Ballard, J. ; Bernat, B. ; DeWolf, W. ; Han, M. ; Lemieux, C. ; Smith, D. ; Weiler, S. ; Wright, S.K. ; Vigers, G. ; Brandhuber, B. *Bioorg.Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 509-512.
- <sup>61</sup> Sundstrom, M. ; Lindqvist, Y. ; Schneider, G. ; Hellman, U. ; Ronne, H. *J Biol Chem* **1993**, 268, (32), 24346-24352.

- 
- <sup>62</sup> Janowicz, Z. A. ; Eckart, M. R. ; Drewke, C. ; Roggenkamp, R. O. ; Hollenberg, C. P. ; Maat, J. ; Ledebøer, A. M. ; Visser, C. ; Verrips, C. T. *Nucleic Acids Res* **1985**, *13*, (9), 3043-3062.
- <sup>63</sup> Metzger, M.H. ; Hollenberg, C.P. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1994**, *42*, 319-325.
- <sup>64</sup> Veitch, N.J. ; Mauger, D.A. ; Cazzulo, J.J. ; Lindqvist, Y. ; Barrett, M.P. *Biochem. J.* **2004**, *382*, 759-767.
- <sup>65</sup> Joshi, S. ; Singh, A.R. ; Kumar, A. ; Misra, P.C. ; Siddiqi, M.I. ; Saxena, J.K. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2008**, *160*, 32-41.
- <sup>66</sup> Sprenger, G.A. *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1216*, 307-310.
- <sup>67</sup> Chen, J.H. ; Gibson, J.L. ; McCue, L.A. ; Tabita, F.R. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 20447-20452.
- <sup>68</sup> de Sury D'Aspremont, R. ; Toussaint, B. ; Vignais, P.M. *Gene* **1996**, *169*, 81-84.
- <sup>69</sup> Van Den Bergh, E.R.E. ; Baker, S.C. ; Raggars, R.J. ; Terpstra, P. ; Woudstra, E.C. ; Dijkhuizen, L. ; Meijer, W.G. *J. Bacteriol.* **1996**, *178*, 888-893.
- <sup>70</sup> Schäferjohann, J. ; Yoo, J.G. ; Kusian, B. ; Bowien, B. *J. Bacteriol.* **1993**, *175*, 7329-7340.
- <sup>71</sup> Fleischmann, R. D. ; Adams, M. D. ; White, O. ; Clayton, R.A. ; Kirkness, E.F. ; Kerlavage, A.R. ; Bult, C.J. Tomb, J. ; Dougherty, B.A. ; Merrick, J.M. ; McKenny, D. ; Sutton, G. ; FitzHugh, W. ; Fields, C. ; Gocayne, J.D. Scott, J. ; Shirley, R. ; Liu, L. ; Glodek, A. ; Kelley, J.M. ; Weidman, J.F. ; Phillips, C.A. ; Spriggs, T. ; Hedblom, E. ; Cotton, M.D. ; Utterback, T.R. ; Hanna, M.C. ; Nguyen, D.T. ; Saudek, D.M. ; Brandon, R.C. ; Fine, L.B. ; Fritchman, J.L. ; Fuhrmann, J.L., Geoghagen, N.S.M. ; Gnehm, C.L. ; McDonald, L.A. ; Small, K.V. ; Fraser, C.M. ; O'Smith, H. ; Venter, J.C. *Science* **1995**, *269*, 496-512.
- <sup>72</sup> Bernacchia, G. ; Schwall, G. ; Lottspeich, F. ; Salamini, F. ; Bartels, D. *EMBO J.* **1995**, *14*, 610-618.
- <sup>73</sup> Gerhardt, S. ; Echt, S. ; Busch, M. ; Freigang, J. ; Auerbach, G. ; Bader, G. ; Martin, F.M ; Bacher, A. ; Huber, R. ; Fischer, M. *Plant Physiol.* **2003**, *132*, 1941-1949.
- <sup>74</sup> Coy, J.F. ; Dubel, S. ; Kioschis, P. ; Thomas, K. ; Micklem, G. ; Delius, H. ; Poustka, A. *Genomics* **1996**, *32*, 309-316.
- <sup>75</sup> Kim, S.F. ; Kim, B. ; Jeng, J. ; Soh, Y. ; Bak, C.I. ; Huh, J.W. ; Song, B.J. *J. Biochem. Mol. Biol.* **1996**, *29*, (2), 146-150.
- <sup>76</sup> Salamon, C. ; Chervenak, M. Piatigorsky, J. ; Sax, C.M. *Genomics* **1998**, *48*, 209-220.

- 
- <sup>77</sup> Schenck, G. ; Layfield, R. ; Candy, J.M. ; Duggleby, R.G. ; Nixon, P.F. *J. Mol. Evol.* **1997**, 44, 552-572.
- <sup>78</sup> Schaff-Gerstenschlager, I. ; Mannhaupt, G. ; Vetter, I. ; Zimmermann, F.K. ; Feldmann, H. *Eur. J. Biochem.* **1993**, 217, 487-492.
- <sup>79</sup> Sundstrom, M. ; Lindqvist, Y. ; Schneider, G. ; Hellman, U. ; Ronne, H. *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, (32), 24346-
- <sup>80</sup> Wikner, C. ; Meshalkina, L. ; Nilsson, U. ; Nikkola, M. ; Lindqvist, Y. ; Sundstrom, M. ; Schneider, G. *J Biol Chem* **1994**, 269, (51), 32144
- <sup>81</sup> Hobbs, G.R. ; Mitra, R.K. ; Chauchan, R.P. ; Woodley, J.M. ; Lilly, M.D. *J. Biotechnol.* **1996**, 45, 173-179.
- <sup>82</sup> Hibbert, E.G. ; Senussi, T. ; Costelloe, S.J. ; Lei, W. ; Smith, M.E.B. ; Ward, J.M. ; Hailes, H.C. ; Dalby, P.A. *J. Biotechnol.* **2007**, 131, 425-432.
- <sup>83</sup> Wang, J.J.L. ; Martin, P.R. ; Singleton, C.K. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, 1341, 165-172.
- <sup>84</sup> Schenk, G. ; Duggleby, R.G. ; Nixon, P.F. ; *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **1998**, 30, 369-378.
- <sup>85</sup> Nikkola, M. ; Lindqvist, Y. ; Schneider, G. *J Mol Biol* **1994**, 238, (3), 387.
- <sup>86</sup> Fiedler, E. ; Thorell, S. ; Sandalova, T. ; Ralph, G. ; König, S. ; Schneider, G. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, 99, (2), 591-595.
- <sup>87</sup> Asztalos, P. ; Parthier, C. ; Golbik, R. ; Kleinschmidt, M. ; Hubner, G. ; Weiss, M.S. ; Friedemann, R. ; Wille, G. ; Tittmann, K. *Biochemistry* **2007**, 46, 12037-12052.
- <sup>88</sup> Meshalkina, L. ; Nilsson, U. ; Wikner, C. ; Kostikowa, T. ; Schneider, G. *Eur J Biochem* **1997**, 244, (2), 646.
- <sup>89</sup> Lindqvist, Y. ; Schneider, G. ; Ermler, U. ; Sundstrom, M. *EMBO J* **1992**, 11, (7), 2373.
- <sup>90</sup> Muller, Y. A. ; Schumacher, G. ; Rudolph, R. ; Schulz, G. E. *J Mol Biol* **1994**, 237, (3), 315-335.
- <sup>91</sup> Dyda, F. ; Furey, W. ; Swaminathan, S. ; Sax, M. ; Farrenkopf, B. ; Jordan, F. *Biochemistry* **1993**, 32, (24), 6165.
- <sup>92</sup> Esakova, O.A. ; Meshalkina, L.E. ; Kochetov, G.A. *Life Sciences* **2005**, 78, 8-13.
- <sup>93</sup> Hawkins, C. F. ; Borges, A. ; Perham, R. N. *FEBS Lett* **1989**, 255, (1), 77-82.
- <sup>94</sup> Nilsson, U. ; Meshalkina, L. ; Lindqvist, Y. ; Schneider, G. *J Biol Chem* **1997**, 272, (3), 1864-1869.
- <sup>95</sup> Nilsson, U. ; Hecquet, L. ; Gefflaut, T. ; Guerard, C. ; Schneider, G. *FEBS Lett* **1998**, 424, (1-2), 49-52.
- <sup>96</sup> Usmanov, R. A. ; Kochetov, G. A. *Biochem Int* **1983**, 6, (5), 673-683.

- 
- <sup>97</sup> Obiol-Pardo, C. ; Rubio-Martinez, J. *J. Mol. Graph. Model.* **2009**, 27, 723-734.
- <sup>98</sup> Wikner, C. ; Nilsson, U. ; Meshalkina, L. ; Udekwu, C. ; Lindqvist, Y. ; Schneider, G. *Biochemistry* **1997**, 36, (50), 15643-15649.
- <sup>99</sup> Morris, K.G. ; Smith, M.E.B. ; Turner, N.J. ; Lilly, M.D. ; Mitra, R.K. ; Woodley, J.M. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, 7, (8), 2185-2188.
- <sup>100</sup> Racker E., Transketolase. In P.D. Boyer, Lardy and Myrback K. (Editors). *The Enzymes*, Vol. 5, Academic Press, New York, **1961**, 397-406.
- <sup>101</sup> Bolte, J. ; Demuynck, C. ; Constant, O. ; Hecquet, L. In S. Servi (Editor), *Microbial Reagents in Organic Synthesis* **1992**, 57-66.
- <sup>102</sup> Besse, P. ; Bolte, J. ; Demuynck, C. ; Hecquet, L. ; Veschambre, H. *Recent Res. Devel. In Organic Chem.* **1997**, 1, 191-228.
- <sup>103</sup> Demuynck, C. ; Bolte, J. ; Hecquet, L. ; Samaki, H. *Carbohydr Res* **1990**, 206, (1), 79.
- <sup>104</sup> Hecquet, L. ; Bolte, J. ; Demuynck, C. *Tetrahedron* **1996**, 52, (24), 8223-8332.
- <sup>105</sup> Myles, D.C. ; Andrulis III, P.J. ; Whitesides, G.M. *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, (37), 4835-4838.
- <sup>106</sup> Ziegler, T. ; Straub, A. ; Effenberger, F. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **1988**, 27, (5), 716-717.
- <sup>107</sup> Ingram, C.U. ; Bommer, M. ; Smith, M.E.B. ; Dalby, P.A. ; Ward, J.M. ; Hailes, H.C. ; Lye, G.J. *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, 96, (3), 559-569.
- <sup>108</sup> Zimmermann, F.T. ; Schneider, A. ; Schorken, U. ; Sprenger, G.A. ; Fessner, W.-D. *Tetrahedron : Asymmetry* **1999**, 10, (9), 1643-1646.
- <sup>109</sup> Guérard, C. ; Alphand, V. ; Archelas, A. ; Demuynck, C. ; Hecquet, L. ; Furstoss, R. ; Bolte, J. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 1999, (12), 3399.
- <sup>110</sup> Charmantray, F. ; Hélaine, V. ; Legeret, B. ; Hecquet, L. *J. mol. Catal. B : Enz.* **2009**, 57, 6-9.
- <sup>111</sup> Hecquet, L. ; Bolte, J. ; Demuynck, C. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **1993**, 57, 2174-2176.
- <sup>112</sup> Naula, C. ; Alibu, V.P. ; Brock, J. ; Veitch, N.J. ; Burchmore, R.J.S. ; Barrett, M.P. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2008**, 70, 1185-1187
- <sup>113</sup> Lee, J.Y. ; Cheong, D.E. ; Kim, G.J. *Biotechnol. Lett.* **2008**, 30, 899-904.
- <sup>114</sup> Smith, M.E.B. ; Kaulmann, U. ; Ward, J.M. ; Hailes, H.C. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 7062-7065.

- 
- <sup>115</sup> Sevestre, A. ; Charmantray, F. ; Hélaine, V. ; Lasikova, A. ; Hecquet, L. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 3969-3976.
- <sup>116</sup> Hibbert, E.G. ; Senussi, T. ; Costelloe, S.J. ; Lei, W. ; Smith, M.E.B. ; Ward, J.M. ; Hailes, H.C. ; Dalby, P.A. *J. Biotechnol.* **2007**, *131*, 425-432.
- <sup>117</sup> Hibbert, E.G. ; Senussi, T. ; Smith, M.E.B. ; Costelloe, S.J. ; Ward, J.M. ; Hailes, H.C. ; Dalby, P.A. *J. Biotechnol.* **2008**, *134*, 240-245.
- <sup>118</sup> Smith, M.E.B. ; Hibbert, E.G. ; Jones, A.B. ; Dalby, P.A. ; Hailes, H.C. *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 2631-2638.
- <sup>119</sup> Kobori, Y. ; Myles, D.C. ; Withesides, G.M. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5899-5907.
- <sup>120</sup> Sprenger, G.A. ; Pohl, M. *J. Mol. Cat. Enz. B* **1999**, *6*, 145-159.
- <sup>121</sup> Morris, K.G. ; Smith, M.E.B. ; Turner, N.J. ; Lilly, M.D. ; Mitra, R.K. ; Woodley, J.M. *Tetrahedron : Asymm.* **1996**, *7*, 2185-2188.
- <sup>122</sup> Machajewski, T. D. ; Wong, C. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1352-1374
- <sup>123</sup> Straub, A. ; Effenberger, F. ; Fischer, P. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 3926-3932.
- <sup>124</sup> Kajimoto, T. ; Liu, K.K.C. ; Pederson, R.L. ; Zhong, Z. ; Ichikawa, Y. ; Porco, J.A. ; Wong, C.H. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6187-6196.
- <sup>125</sup> Schoevaart, R. ; van Rantwijk, F. ; Sheldon, R.A. *Tetrahedron : Asymmetry* **1999**, *10*, 705-711.
- <sup>126</sup> Bednarski, M.D. ; Simon, E.S. ; Bischofberger, N. ; Fessner, W.D. ; Kim, M.J. ; Lees, Watson, Saito, T. ; Waldmann, H. ; Whitesides, G.M. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 627-635.
- <sup>127</sup> Morse, D.E. ; Horecker, B.L. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1968**, *31*, 125-181.
- <sup>128</sup> Charmantray, F. ; El Blidi, L. ; Gefflaut, T. ; Hecquet, L. ; Bolte, J. ; Lemaire, M. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 9310-9312.
- <sup>129</sup> Charmantray, F. ; Dellis, P. ; Samreth, S. ; Hecquet, L. *Tetrahedron Letters* **2006**, *47*, 3261-3263
- <sup>130</sup> Schürmann, M. ; Sprenger, G.A. *J. Bio. Chem.* **2001**, *276*, 11055-11061.
- <sup>131</sup> Castillo, J.A. ; Calveras, J. ; Casas, J. ; Mitjans, M. ; Vinardell, P.M. ; Parella, T. ; Inoue, T. ; Sprenger, A.G. ; Joglar, J. ; Clapes, P. *Org Lett.* **2006**, *8*, 6067-6070.
- <sup>132</sup> Garrabou, X. ; Castillo, J.A. ; Guérard-Hélaine, C. ; Parella, T. ; Joglar, J. ; Lemaire, M. ; Clapés, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5521-5525.
- <sup>133</sup> Tomoyuki, I. *Microbial aldolases as C-C bonding enzymes : Investigation of structural-functional characteristics and application for stereoselective reactions* [en ligne], Thèse de

- 
- Sciences Naturelles, Université de Stuttgart, **2006**, disponible sur : <http://elib.uni-stuttgart.de/opus/volltexte/2007/2816> (consulté le 15/09/09)
- <sup>134</sup> Sprenger, G.A. ; Schürmann, M. ; Schürmann, M. ; Johnen, S. ; Sprenger, G. ; Sahm, H. ; Inoue, T. ; Schörken, U. C-C-bonding microbial enzymes: thiamine diphosphate-dependent enzymes and class I aldolases. In *Asymmetric Synthesis with chemical and biological methods* : Enders, D. ; Jaeger, K.-E. (Editors) Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA: Weinheim, **2007**, 312-326.
- <sup>135</sup> Bolte, J. ; Demuynck, C. ; Samaki, H. *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, (45), 5525-5528.
- <sup>136</sup> Hettwer, J. ; Oldenburg, H. ; Flaschel, E. *J. Mol. Cat. B Enz.* **2002**, 19-20, 215-222.
- <sup>137</sup> Humphrey, A.J. ; Turner, N.J. ; McCague, R. ; Taylor, S.J.C. *J. Chem. Soc. , Chem. Commun.* **1995**, 24, 2475-2476.
- <sup>138</sup> Tian, S.K. ; Hong, R. ; Deng, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 9900-9901.
- <sup>139</sup> Brewster, P. ; Hiron, F. ; Hughes, E.D. ; Ingold, C.K. ; Rao, P.A.D.S. *Nature* **1950**, 166, 179.
- <sup>140</sup> Effenberger, F. ; Hopf, M. ; Ziegler, T. ; Hudelmayer, J. *Chem. Ber.* **1991**, 124, 1651-1659.
- <sup>141</sup> Sugano, H. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1973**, 46, (7), 2168-2174.
- <sup>142</sup> Kleemann, A. ; Lehmann, B. ; Martens, J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1979**, 18, 797.
- <sup>143</sup> Massad, S.K. ; Hawkins, L.D. ; Baker, D.C. *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 5180-5182.
- <sup>144</sup> Pilli, R.A. ; Victor, M.M. ; de Meijere A. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 5910-5916.
- <sup>145</sup> Marshall, J.A. ; Xie, S. *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 7230-7237.
- <sup>146</sup> Suri, T. J. ; Susumu, M. ; Albertshofer, K. ; Tanaka, F. ; Barbas C. F. III *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 3822-3828.
- <sup>147</sup> Ramasastry, S.S.V. ; Albertshofer, K. ; Utsumi, N. ; Tanaka, F. ; Barbas C.F. III *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 5572-5575.
- <sup>148</sup> Utsumi, N. ; Imai, M. ; Tanaka, F. ; Ramasastry, S. S. V. ; Barbas C. F. III *Org. Lett.* **2007**, 9, 3445-3448.
- <sup>149</sup> Enders, D. ; Grondal, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 1210-1212.
- <sup>150</sup> Enders, D. ; Voith, M. ; Ince, S. J. *Synthesis* **2002**, 12, 1775-1779.
- <sup>151</sup> Mlynarski, J. ; Paradowska, J. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 1502-1511.
- <sup>152</sup> Handley, P.N. ; Carman, R. M. *Aust. J. Chem.* **2001**, 54, 769-776.
- <sup>153</sup> Li, A.H. ; Moro, S. ; Forsyth, N. ; Melman, N. ; Ji, X. ; Jacobson, K. A. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 706-721.
- <sup>154</sup> Brown, R. ; Jones, W.E. ; Pinder, A.R. *J. Chem. Soc.* **1951**, 2123-2125.

- 
- <sup>155</sup> Florio, P. ; Thomson, R. J. ; von Itzstein, M. *Carbohydr. Res.* **2000**, 328, 445-448.
- <sup>156</sup> Siebum, A. H. G. ; Woo, W. S. ; Raap, J. ; Lugtenburg, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 13, 2905-2913.
- <sup>157</sup> Ko, S.Y. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 2689-2691.
- <sup>158</sup> Sharpless, K.H. ; Amberg, W. ; Bennani, Y.L. ; Crispino, G.A. ; Hartung, J. ; Jeong, K.S. ; Kwong, H.L. ; Morikawa, K. ; Wang, Z.M. ; Xu, D. ; Zhang, X.L. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 2768-2771.
- <sup>159</sup> Junttila, M.H. ; Hormi, O.O.E. *J. Org. Chem.* **2009**, 74, 3038-3047.
- <sup>160</sup> Boruwa, J. ; Barua, N.C. *Tetrahedron* **2006**, 62, (6), 1193-1198.
- <sup>161</sup> Svarek, W.A. ; Zamojski, A. ; Tiwari, K.N. Isoni, E.R. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 3827-
- <sup>162</sup> Myles, D.C. ; Andrulis, P.J. ; Withesides, G.M. *Tetrahedron* **2008**, 64, 5794-5799.
- <sup>163</sup> Matsumoto, K. ; Shimagaki, M. ; Nakata, T. ; Oishi, T. *Tetrahedron Lett.* **1991**, 34, 4935-4938.
- <sup>164</sup> Chênevert, R. ; Dasser, M. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 4529-4531.
- <sup>165</sup> Procopiu, A.P. ; Biggadike, K. ; Englich, F.A. ; Farrell, M.R. ; Hagger, N.G. ; Hancock, F.P.A. ; Hasse, V.M. ; Irving, R.W. ; Sareen, M. ; Snowden, A.M. ; Solanke, E.Y. ; Tralau-Stewart, J.C. ; Walton, E.S. ; Wood, A.J. *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 602-612.
- <sup>166</sup> Zhong, L.Y. ; Shing, M. K. T. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 2622-2624.
- <sup>167</sup> Grahams Solomons, J.T. ; Zimmerly, E.M. ; Burns, S. ; Krishnamurthy, N. ; Swan, M.K. ; Krings, S. ; Muirhead, H. ; Chirgwin, J. ; Davies, C. *J. Mol. Biol.* **2004**, 342, 847-860.
- <sup>168</sup> Datsenko, K.A. ; Wanner, B.L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, (12), 6640-6645.
- <sup>169</sup> *Cellular and molecular Biology*. Neidhardt et al. (2d edition) **1996** ASM Press



## Résumé

La transcétolase (TK) permet de synthétiser des cétooses *D-thréo* par formation stéréospécifique d'une liaison C-C. L'objectif de ces travaux vise à modifier la spécificité de substrat de la TK de *Saccharomyces cerevisiae* par mutagenèse afin d'élargir le potentiel synthétique aux aldoses *D-thréo* et cétooses *L-érythro*. Notre stratégie a consisté à créer des banques de TK mutées à partir de courtes séquences du gène TKL1 (identifiées d'après la structure 3D) qui ont été dégénérées grâce à une approche de type « cassette mutagenesis ». Pour identifier les TK recherchées, nous avons développé un test de sélection *in vivo* basé sur l'auxotrophie vis-à-vis d'un acide aminé. Dans ce but, nous avons synthétisé des sondes appropriées comportant un motif reconnu par la TK naturelle (cétoose *D-thréo*) ou par les TK mutées recherchées (cétoose *L-érythro* ou aldose *D-thréo*) et la chaîne latérale d'un acide aminé (alanine, valine, leucine, méthionine, thréonine). La faisabilité de ce test a été étudiée en présence des composés cétoose *D-thréo* et de la TK sauvage. *In vitro*, nous avons montré que ces différents composés sont des substrats de la TK. Pour le développement du test de sélection *in vivo* dans *E.coli*, les substrats précurseurs de la leucine et de la méthionine ont été retenus en raison de la stabilité de l'auxotrophie pour ces acides aminés. Les meilleurs taux de croissance ont été obtenus avec la sonde cétoose *D-thréo* précurseur de la méthionine.

**Mots clés** : transcétolase, mutagenèse, cassette mutagenesis, test de sélection.

## Abstract

Transketolase (TK) catalyses the *D-threo* ketose synthesis by stereospecific formation of a C-C bond. The objective of this work consisted in modifying the substrate specificity of TK from *Saccharomyces cerevisiae* by mutagenesis to extend the synthetic potential to *D-threo* aldoses and *L-erythro* ketoses. Our strategy was based on the creation of TK libraries from TKL1 gene short sequences (identified from 3D structure) using cassette mutagenesis techniques. For identifying desired TK, we developed an *in vivo* selection test based on amino acid auxotrophy. Consequently, we synthesised corresponding probes bearing a moiety recognised by wild type TK (*D-threo* ketose) or mutant TK (*L-erythro* ketose or *D-threo* aldose) and the side chain of an amino acid (alanine, valine, leucine, methionine, threonine). We investigated this selection test in the presence of *D-threo* ketoses and wild type TK. *In vitro* we showed that these compounds were substrates for TK. Concerning the *in vivo* test, we chose leucine and methionine precursors due to the tightness and stability of *E. coli* auxotrophs. The higher growth rates were obtained with *D-threo* ketose probe, precursor of methionine.

**Keywords** : transketolase, mutagenesis, cassette mutagenesis, selection test